

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN FOXE1 Y SOX9 EN LA CÉLULA
FOLICULAR TIROIDEA**

TESIS DOCTORAL

ARÍSTIDES LÓPEZ MÁRQUEZ

MADRID, 2017

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Expresión y función de los factores de transcripción FoxE1 y Sox9 en la célula folicular tiroidea

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Arístides López Márquez

Licenciado en Bioquímica

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora de Tesis:

Dra. Pilar Santisteban Sanz

Profesora de Investigación del CSIC

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

CSIC-UAM

Madrid, 2017

Pilar Santisteban Sanz, Doctora en Biología y Profesora de Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM,

CERTIFICA QUE: Arístides López Márquez, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo:

“Expresión y función de los factores de transcripción FoxE1 y Sox9 en la célula folicular tiroidea”

En esta memoria de tesis doctoral se ha estudiado la regulación de la expresión por TSH y TGF β de los factores de transcripción FoxE1 y Sox9 en la diferenciación de las células foliculares tiroideas. Mediante análisis *in silico* y ensayos funcionales se ha descrito la existencia de una intercomunicación cruzada entre las vías de cAMP/PKA y las proteínas Smads. Asimismo se ha descrito la participación de otros factores de transcripción como Nkx2-1 y Pax8 en ese circuito regulatorio del control de la diferenciación tiroidea. Para llevar a cabo este trabajo se han usado como modelos cultivos celulares, células madre embrionarias (mESC), células foliculares de tiroides de rata y ratón embrionario y adulto.

El trabajo realizado por el doctorando ha sido de gran calidad demostrando su responsabilidad científica, su dedicación al trabajo y el juicio crítico necesario en la búsqueda de nuevos conocimientos científicos.

Considero por tanto este trabajo satisfactorio y apto para ser presentado como tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Madrid a 5 de mayo de 2017.

Fdo. Pilar Santisteban Sanz



Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la profesora Pilar Santisteban Sanz en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM), financiado por una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Universidad Autónoma de Madrid.

*“Tratad de dejar este mundo en mejores condiciones de
cómo os lo encontrasteis”*

Último mensaje de Sir Lord Robert S. Smith Baden-Powell of Gilwell,
Fundador del Movimiento Scout y primer Jefe Scout Mundial

A mis padres, Rosario y Arístides

A mis abuelas, Lalo y María

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no podría haber salido adelante sin el trabajo, apoyo y ayuda de una lista enorme de gente, por lo que mis agradecimientos no pueden dejar de ser numerosos y sinceros. Escribo estas líneas en un tren en algún punto entre Madrid y Sanlúcar. Estos agradecimientos estarán también repartidos entre estos dos lugares, aunque con algunas paradas intermedias.

En primer lugar debo, y quiero, dar las gracias a Pilar, mi directora de tesis, La Jefa. Me da la sensación de que las palabras “gracias” y “agradecimientos” se quedan cortas para todo lo que me gustaría expresar en estas pocas líneas. En primer lugar gracias por, hace ya más de 6 años, haberme hecho aquella entrevista en la que casi hablamos más de Manzanilla y en que bares encontrarla en Madrid que de tiroides. Salí de ese despacho y de ese laboratorio convencido de que era ahí donde quería hacer mi tesis doctoral. Gracias por tu apoyo, tus ánimos, tus gritos y tu sentido del humor. Gracias por tantas risas. Gracias por enseñarme a hacer ciencia de calidad y por tener esa memoria privilegiada capaz de recordar autores, año, revista y título de cada publicación de tiroides. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu laboratorio y apoyarme y financiarme cuando parecía imposible conseguir una beca de doctorado. Siempre me sentí respaldado para poder seguir intentándolo. No sabes que importante fue aquello para mí. Gracias por ser una de las personas más “jóvenes” que conozco y hacer que sea tan fácil y tan divertido hablar de ciencia, de bares, de viajes, o de todo a la vez. Gracias por crear ese ambiente de trabajo tan familiar y tan cómodo que creas en tu laboratorio. Los que aquí nos hemos “criado” creo que no valoramos lo suficiente el lujo que es trabajar así. Gracias por tantísimos guateques, por tantas cenas en tu casa, por tantos momentos que no olvidaré jamás. Gracias por enseñarme, en definitiva, a ser un buen científico pero a la vez disfrutar de la buena mesa y el buen vino, es decir, de la buena vida. Gracias Pilar. Y Pilar no sería Pilar sin Edu, el jefe consorte. Gracias, en primer lugar, por ser tan generoso y por apoyar, ayudar y acompañar desde hace tantos años a la jefa. Esto es fundamental, más de lo que crees, para Pilar, para nosotros y para el laboratorio, que no sería lo mismo sin ti. Gracias por ser como eres, por tu fuerza, por tus ganas de disfrutar de la vida; y, venga, también por tus chistes. Gracias por tus consejos sobre bares de Madrid, España y parte del extranjero. Gracias por cocinar como cocinas, por esas croquetas y aquel botillo. Y gracias por preparar los mejores gin tonics que he probado en mi vida. Edu, de corazón, gracias por tu amistad y tu cariño.

La ciencia es un trabajo en equipo, por lo que esta tesis no habría salido adelante sin todas las personas que en estos años han pasado por el 2.9. Gracias Ana, por enseñarme todo lo que debía saber y enseñarme a “volar solo” en un laboratorio. Gracias por tener tanta paciencia para ponerte conmigo a hacer un western, cultivos o mi primera PCR. Fuiste mi “subjefa” y así te veré siempre. Y hablando de históricos del 2.9, hay que seguir con Miguel, sin el que el 2.9 no sería el 2.9. Muchas gracias Miguel por tu apoyo, tus conversaciones y tus consejos. Gracias por saber tantísimo de tiroides y de vías de señalización. Eres fundamental en este laboratorio. Garci, muchas gracias por ser tan buena persona, por tus consejos siempre tan sinceros y por tener ese ánimo de ayudar en todo momento. Gracias por soportar mis coñas con tu ropa, sabes que son desde el cariño, ~~a pesar de que nunca me traes cecina de León~~. Corrección: Al final trajiste, eres un campeón. Antonio, muchas gracias por enseñarme la importancia de un control de carga y por los buenos ratos que hemos pasado. Lara, muchas gracias por tus risas, nuestras conversaciones extra científicas, por haberme enseñado a explorar los promotores de los genes y por haberme hecho tan fácil trabajar contigo. No se me olvidará aquel mes de agosto revisando los comentarios de los referees de la review. Petri, muchas gracias por nuestras charlas de última hora ya de noche en el labo, por tu seriedad, tu profesionalidad y tu cariño. Espero que en esta nueva etapa que empiezas seas muy feliz. Gracias León, por tu vitalidad, por los ratos que hemos compartido en tantos congresos y por ser tan entusiasta. Seguro que el futuro te tiene preparadas grandes cosas. Jesús, gracias por ser un compañero de “pupitre” tan respetuoso y tranquilo, pudiendo

haber escrito esta tesis casi sin bajar a los infiernos de la biblioteca. Ha sido un auténtico placer compartir contigo estos años, y los que vengan. Y gracias a las nuevas generaciones: Adri, gracias por estar siempre dispuesto a echarme una mano, bien con una inmunohistoquímica o con el dichoso Excel. Eres un tío brillante. Vente a vivir a Madrid ya. Celia, muchas gracias por hacer que me ría tanto. Eres la persona más divertida que he conocido dentro del 2.9, con diferencia. Julia, eres la promesa del laboratorio. Una trabajadora y una científica genial. Seguro que todo lo que queda por venir, que es mucho, será increíble. Carlos, el mejor “pupilo” que me pudo tocar. Gracias por ser tan responsable, tan divertido, tan buena gente y tan trabajador. Ha sido un placer trabajar contigo. Espero que lo siga siendo en el futuro y que nos sigan tocando cestas de lo que sea, a poder ser de ibéricos en lugar de frutas. Y Andrea, nuestra sargento del 2.9. Gracias por tus broncas, tus enfados y tus quejas. Sirven para que el laboratorio esté todo en orden. Pero gracias también por tu amabilidad y tu inocencia. Gracias a todos por haber dado un soplo de aire fresco al laboratorio y por haberos acoplado a este ecosistema un tanto peculiar que tenemos en el 2.9. Ya fuera del 2.9 he conocido gente maravillosa en el IIB. Me gustaría agradecer en particular a Elvira, la mejor compañera de congresos, confidencias, y conversaciones sobre la vida y la ciencia. Gracias por todos esos ratos de “vidorra” que hemos disfrutado juntos, que sean muchos más. Y aunque sea del IIB y del 2.9, menciono aparte merece Suzana. Desde el primer día me regalaste tu amistad. Gracias por mostrarme la otra cara de la ciencia, por tantos vinos, por enseñarme Madrid. Gracias por tantos viajes y tantos buenos ratos. Gracias por Brasil. Gracias por ser tan valiente y ser una luchadora y una superviviente. Gracias por ser enfermizamente buena y por tener ese carácter tan tuyo. Nos quedan muchos vinos que tomarnos, en Granada, en Madrid o en el mundo. Gracias por estar ahí.

Toca agradecer a la gente con la que he recorrido este camino paso a paso y en paralelo. En primer lugar a mis “Biolokos” de Sevilla: Clara, Cholo, Maca, Ale, Elsa y tanta buena gente que pasó y se quedó o pasó y se fue. Hace una vida que empezamos la carrera y aún sigo emocionándome cuando paso por Sevilla y Reina Mercedes y veo la Facultad. Gracias a todos por haber vivido conmigo esos años en los que todo era nuevo y en los que vivimos y disfrutamos tanto. Gracias a todos por seguir estando ahí. Y gracias Lucas, porque si no te hubiera conocido aquella Feria de Abril esta tesis nunca se hubiera escrito. Y llegó Madrid. Gracias Elena, la única “gata” de verdad que conozco. Gracias por tu amistad desde el primer día de Bioquímica. Gracias por tantas charlas, tantas fiestas y tantas risas. Madrid, la calle Áncora y yo te echamos mucho de menos. Gracias Alba Mota por conocer todos los trámites y papeleos, por ser tan buena científica y tan divertida a la vez, por ser la mejor compañera para el Ocho Y Medio posible y por tantas charlas y tantas cervezas. Habrá muchos éxitos que celebrar. Gracias Sofía por cuidarme tanto y haberme permitido reírme contigo hasta no poder más. Eres una de las mejores personas que conozco y es un lujo poder decir que soy tu amigo. Alba Jiménez, desde ese día que nos conocimos en Barcelona me di cuenta que merecías la pena. Gracias por tener en la cabeza siempre el mejor plan para despejarnos después de una semana horrible de laboratorio. Sandra, espero que el día de mi tesis no te duela las piernas y vengas aún más elegante de lo que vas siempre, si cabe. Gracias por tu amistad y por ser tan especial. Quique, gracias por tu paciencia, por darme paracetamol en Granada para la resaca, y por tener esa mezcla tan genial de seriedad y diversión. Gracias por buscar siempre el hueco para tomarnos una caña por mucho que madrugues al día siguiente. Y Pablo, que bien que reaparecieras tan de repente y como de la nada. Gracias por tantas charlas intensas o banales, gracias por tu cariño, por tu apoyo y por ser tan tremendamente amable. Y gracias por ser el mejor diseñador de portadas del planeta. Ve buscando un piso en condiciones en NY. Y gracias a todos mis compañeros del laboratorio de la Dra. Sabine Costagliola de la Universidad Libre de Bruselas: Andrea, Miriam, Nico, Nika, Giuliano, Achim y todos los que hicisteis que pasara tres meses en Bruselas maravillosos, tanto a nivel científico como a nivel personal. Quiero agradecer especialmente al Dr. Christophe Pierreux y a su grupo, de la Universidad Católica de Leuven, por el apoyo y la colaboración en esta tesis con las inmunofluorescencias de gran calidad y utilidad de tiroides embrionarios que se presentan en esta tesis.

No solo científicos han participado en esta tesis. Mis amigos han sido fundamentales para poder llegar hasta aquí. Simplemente sin ellos no hubiera sido posible. En general, gracias a todos por estar tan orgullosos de mí, seguro que más de lo debido, y por aguantar mis discursitos sobre ciencia, becas, tesis y demás pesadillas. Por ir al punto de partida, empiezo por Sanlúcar. Gracias a mi gente de la “Tralla”: Juan, Kaylee, Maite, Elena y Chica. Gracias por ser siempre la mejor válvula de escape y por matarme de risa. Sois medicina. Espero que nunca nos hagamos mayores. Gracias a mi gente del “Alto Standing” por alegraros de mis éxitos más que yo mismo. Gracias a los Scouts por haberme educado en la tarea de “hacer siempre lo mejor”. Sois parte de lo que soy. Gracias a mis “columnas”, los que me soportan y me sustentan: Alba, gracias por ser tan especial, tan generosa y tener tanta paciencia. Es una maravilla tenerte en mi vida y en Madrid. Ángela, esto empezó contigo. Gracias por acompañarme a la Facultad de Biología mi primer día como universitario. Gracias por ser mi amiga, por ser todo corazón y por hacerme reír como nadie. Arga, gracias a Ángela entraste en mi vida poco a poco y ya no hay vuelta atrás. Gracias por tu cariño y por ser como eres. Que os hayáis venido a Madrid ha sido para mí el mejor regalo que os podáis imaginar. Pacote, gracias por ser el mejor amigo que se puede tener. Gracias por estar “Siempre listo” cuando te he necesitado. Gracias por tantas risas y tanto vivido juntos. Gracias por tanto interés en mi trabajo, a pesar de que nunca se si me explico bien. Haría falta otra tesis para agradecerle tantas cosas. Seguiremos caminando juntos esta ruta. Y María, gracias por estar siempre y por no haberme fallado jamás. Esto también nació contigo. Hace muchos años soñábamos con Madrid y, aunque la terraza con vistas al Retiro no ha llegado aún, aquí estamos y estamos juntos. Nos queda mucho camino por andar y será genial recorrerlo contigo, como siempre. Gracias y mil veces gracias.

Madrid no sería lo mismo sin tanta gente que me he encontrado y ha formado parte de este proceso. Gracias Inés, por tantas noches de debate, de política e intentos de arreglar el mundo a golpe de brindis. Gracias Sara y Jaime por ser los mejores anfitriones. Vuestra terraza de Lavapiés ha sido el mejor de los lugares para desconectar. Ana, era difícil encuadrarte entre Madrid y Sanlúcar. Mil gracias por los ánimos, en septiembre habrá mucho que celebrar. Regina, gracias por tu cariño y por estar siempre tan interesada en mi trabajo, seguro que te harás una pediatra de lujo. Elena, mi doctorsita, gracias por haberme alegrado tantas tardes y tantas noches. Gracias por tantas risas. Nos debemos un viaje a NY. Macarena gracias por ser tan sincera conmigo y por cuidarme tanto. Gracias por dejarme ser tu amigo, es una pasada. Gracias por tantas tardes en tu casa después del laboratorio, y aquí extendiendo el agradecimiento a tus padres, Amparo y Santiago. Y para acabar, Álvaro. Gracias por hacerme reír tanto, y por haber hecho que Madrid sea un sitio mejor desde que te conocí. Gracias por tantas comidas y cenas disfrutando como nuestra querida Chon. Y gracias por tantas conversaciones, y a veces discusiones, sobre mil temas serios o ridículos, porque a pesar de que tienes la extraordinaria habilidad de sacarme de quicio, han hecho que los días hayan sido mucho mejores. Gracias.

Me gustaría agradecer, por último, a mi familia, sin ellos esta tesis no podría haber salido adelante. Gracias a mi tío Juan, por su apoyo y sus ánimos. Gracias a mi tía Regla y a José Antonio por vuestra generosidad y por compartir conmigo los éxitos. Gracias a mi tía Pepa y a mi prima Charo, por vuestro cariño y por cuidar tanto de mi familia y de mí. Gracias Pili, mi tía no de sangre, pero si de corazón. Gracias por formar parte de mi familia, cuidarla tanto y hacerlo todo más fácil. Gracias a Guille, mi hermano. Gracias por estar tan orgulloso de mí. Ese orgullo es una responsabilidad enorme que me empuja a seguir trabajando y ha sido uno de los mejores estímulos en los momentos duros. Gracias a mi abuela María, que aunque no sepa muy bien de que va esto de la ciencia está muy orgullosa porque su nieto va a ser “Doctor”. Gracias por enseñarme el valor del trabajo y el esfuerzo, y gracias por recordarme con tu ejemplo de dónde vengo y a estar agradecido por la vida “de señorito” que me ha tocado vivir. Gracias a mi abuela Lalo, donde quiera que esté, porque siempre estuvo muy orgullosa de mí y con la que aprendí que había que tener la maleta siempre hecha porque el mundo era muy grande. Seguro que habrá una avispa en la sala el día de la lectura de la tesis. Tú sabes por qué lo digo.

Y gracias por último a mis padres, Arístides y Rosario, que son mi guía y mi ejemplo. Gracias por haberme permitido hacer de mi vida lo que yo elegí y haberme apoyado siempre y sin fisuras. Gracias por empujarme a volar cuando alguna vez he tenido miedo. Gracias por enseñarme a ser libre, por mucho que me echéis de menos. Gracias por vuestros consejos. Gracias por la infinita generosidad. Mamá y papá gracias, simplemente, por todo.

Muchas gracias.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Las células foliculares son el tipo celular mayoritario de la glándula tiroides y expresan las proteínas necesarias para la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, como el Simportador de Sodio/Iodo (NIS), la Tiroperoxidasa (TPO) o la Tiroglobulina (Tg). La expresión de estos marcadores de diferenciación tiroidea está regulada principalmente por TSH, IGF1 y TGF β a través de la expresión y la activación de los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1. La expresión conjunta de estos tres factores tiene lugar exclusivamente en el tiroides desde el inicio de la especificación de los precursores tiroideos en el endodermo faríngeo hasta el tiroides adulto. Aunque se conocen algunas de las vías de señalización y los factores de transcripción implicados en la especificación y diferenciación de las células foliculares tiroideas, aún no se han descifrado los mecanismos subyacentes. Así mismo son desconocidos otros factores de transcripción implicados en esa compleja red transcripcional. Por ese motivo nos propusimos en primer lugar estudiar el papel de las vías de señalización de TSH y TGF β en la regulación de la expresión de FoxE1, como uno de los factores de transcripción esencial en el desarrollo y la diferenciación tiroidea. Además, hemos estudiado la expresión y función en el tiroides de Sox9, factor de transcripción implicado en el desarrollo y diferenciación de órganos de origen endodérmico, como un posible candidato a regular la expresión de los factores de transcripción tiroideos en la especificación y diferenciación de la célula folicular tiroidea. En esta tesis hemos descrito que Sox9 se expresa en las células foliculares del tiroides embrionario concomitantemente a la expresión de los factores de transcripción tiroideos, manteniéndose su expresión durante el desarrollo embrionario hasta el tiroides adulto. Hemos identificado sitios de unión para los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 así como para Smads, Sox9 y sitios CRE en los promotores de FoxE1 y Sox9. Además, hemos demostrado que la TSH induce la expresión de FoxE1 y Sox9 a través de la vía del cAMP/PKA/CREB. El TGF β , a través de las Smads, inhibe el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1 y Sox9. Así mismo nuestros datos muestran que la transcripción de FoxE1 y Sox9 está regulada por Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 a través de la unión a sus respectivos promotores. Aunque está bien aceptado que FoxE1 regula la expresión de TPO y Tg, no se había reportado que dicho factor regulase a NIS. Nuestro estudio ha identificado un sitio de unión de FoxE1 en el promotor de NIS y hemos demostrado su funcionalidad, concluyendo que FoxE1 induce también la expresión de este gen de diferenciación tiroidea. Además, hemos demostrado que Sox9 se une al promotor de FoxE1 y al suyo propio regulando la expresión de ambos genes, confirmando la existencia de circuitos regulatorios transcripcionales en la diferenciación tiroidea. Esta tesis pone de manifiesto la implicación de Sox9 en la diferenciación de la célula folicular y aporta otra vía de estudio sobre la función de nuevos factores de transcripción. Además se ha avanzado en la identificación de nuevas dianas transcripcionales de FoxE1 y en la función de las vías de TSH y TGF β , profundizando en el conocimiento de la regulación de la diferenciación de la célula folicular tiroidea.

SUMMARY

The follicular cells are the major cell type of the thyroid gland and express the necessary proteins for the synthesis and secretion of thyroid hormones, such as the Sodium/Iodine Symporter (NIS), Thyroperoxidase (TPO) or Thyroglobulin (Tg). The expression of these differentiation markers is mainly regulated by TSH, IGF1 and TGF β through the expression and activation of the transcription factors Nkx2-1, Pax8 and FoxE1. The combined expression of these three factors occurs exclusively in the thyroid from the beginning of the specification of thyroid precursors in the pharyngeal endoderm to the adult thyroid. Although some of the signaling pathways and the transcription factors involved in the specification and differentiation of thyroid follicular cells are known, the underlying mechanisms have not yet been deciphered. Also other transcription factors involved in that complex transcriptional network are still unknown. For this reason we proposed to study the role of TSH and TGF β signaling pathways in the regulation of FoxE1 expression as one of the essential transcription factors in thyroid development and differentiation. In addition, we have studied the expression and function in the thyroid of Sox9, a transcription factor involved in the development and differentiation of endodermal-derived-organs, as a possible candidate to regulate the expression of thyroid transcription factors in the specification and differentiation of thyroid follicular cell. In this thesis we have described that Sox9 is expressed in the follicular cells of the embryonic thyroid concomitantly with the expression of the thyroid transcription factors, maintaining its expression during the embryonic development up to the adult thyroid. We have identified binding sites for the thyroid transcription factors Nkx2-1, Pax8 and FoxE1 as well as for Smads, Sox9 and CRE sites in the promoters of FoxE1 and Sox9. In addition, we have demonstrated that TSH induces FoxE1 and Sox9 expression through the cAMP/PKA/CREB pathway. TGF β , through the Smads, inhibits the TSH-induced FoxE1 and Sox9 expression. Also our data show that the transcription of FoxE1 and Sox9 is regulated by Nkx2-1, Pax8 and FoxE1 through binding to their respective promoters. Although it is well accepted that FoxE1 regulates the expression of TPO and Tg, it has not been reported its role in NIS regulation. Our study has identified a FoxE1 binding site in the NIS promoter and we have demonstrated its functionality by concluding that FoxE1 also induces the expression of this thyroid differentiation gene. Furthermore, we have demonstrated that Sox9 binds to the FoxE1 promoter and to its own, regulating the expression of both genes and confirming the existence of transcriptional regulatory circuits in thyroid differentiation. This thesis demonstrates the implication of Sox9 in the differentiation of the thyroid follicular cell and provides another approach to study the function of new transcription factors. In addition, we have progressed in the identification of novel transcriptional FoxE1 targets and in the function of the TSH and TGF β pathways, deepening the knowledge of the regulation of thyroid follicular cell differentiation.

ÍNDICE



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1-. La glándula tiroides	9
1.1-. Morfología.....	9
1.2-. Fisiología de la célula folicular tiroidea: Síntesis de las hormonas tiroideas	10
2-. Vías de señalización implicadas en la función tiroidea	12
2.1-. Tirotropina (TSH).....	12
2.2-. Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1)	14
2.3-. Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)	15
3-.Factores de transcripción tiroideos	17
3.1-. Nk2 Homeobox 1 (Nkx2-1).....	18
3.2-. Paired box gene 8 (Pax8).....	19
3.3-. Forkhead box protein E1 (FoxE1)	20
3.4-. Haematopoietically-expressed homeobox protein (Hhex).....	21
3.5-. Interacción entre los factores de transcripción tiroideos.....	21
4-. Desarrollo embrionario de la glándula tiroides	23
4.1-. Especificación tiroidea	23
4.2-. Migración y foliculogénesis.....	25
4.3-. Nuevos modelos para el estudio del desarrollo embrionario.....	26
5-. Factores de transcripción de la familia Sox	27
5.1-. Sex-determining region Y (SRY)-box 9 protein (Sox9).....	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1-. Materiales	35
1.1-. Anticuerpos	35
1.2-. Plásmidos	35
1.3-. Oligonucleótidos	37
1.4-. Líneas celulares	38
1.5-. Modelos animales	38
2-. Métodos.....	39

2.1-. Análisis <i>in silico</i> de secuencias de DNA	39
2.2-. Cultivos celulares.....	39
2.3-. Determinación de RNA.....	40
2.4-. Detección de proteínas	41
2.5-. Inhibición de la expresión génica: RNA de interferencia	43
2.6-. Transfecciones transitorias	43
2.7-. Ensayos de unión proteína-DNA: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	44
RESULTADOS	45
1-. Regulación de la expresión de FoxE1 y su implicación en la diferenciación de las células foliculares de tiroides.	47
1.1-. Análisis <i>in silico</i> del promotor de FoxE1.....	47
1.2-. TSH induce la expresión de FoxE1 a través de la vía de cAMP/CREB.....	48
1.3-. El factor de transcripción CREM se une a los sitios CRE del promotor de FoxE1 y activa su expresión.	52
1.4-. TGF β inhibe el efecto inductor de TSH sobre la expresión de FoxE1.....	53
1.5-. Los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 se unen al promotor de FoxE1 y cooperan positivamente en la regulación de su expresión.....	56
1.6-. FoxE1 coopera con NF1/CTF para activar la expresión de NIS en la célula folicular diferenciada de tiroides.....	60
2-. Expresión, regulación y función de Sox9 en la diferenciación de las células foliculares de tiroides.	62
2.1-. Sox9 se expresa en el tiroides embrionario de ratón a partir de E10.5.....	62
2.2-. Sox9 se expresa en la célula folicular del tiroides adulto.....	65
2.3-. Análisis <i>in silico</i> del promotor de Sox9.....	66
2.4-. La expresión de Sox9 en la célula folicular tiroidea está regulada por TSH e IGF1.....	67
2.5-. La TSH induce su efecto sobre la expresión de Sox9 a través de la vía del cAMP/PKA/CREB.....	69
2.6-. TGF β inhibe el efecto inductor de TSH sobre la expresión de Sox9.....	72
2.7-. Los factores de transcripción Pax8 y FoxE1 se unen al promotor de Sox9 y regulan su expresión.	75
2.8-. Sox9 se une a su promotor y reprime su activación	79
2.9-. Sox9 regula positivamente la expresión de FoxE1 a través de la unión a su promotor ...	80
DISCUSIÓN	83
Función y regulación de la expresión de FoxE1 en la célula folicular tiroidea	85

La TSH controla la expresión de TPO, Tg y NIS mediante la regulación de la expresión FoxE1 a través de la vía cAMP/PKA/CREB	85
El TGFβ inhibe el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1	88
La expresión de FoxE1 está regulada por los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1.	90
Expresión y función de Sox9 en el control de la diferenciación de la célula folicular tiroidea..	91
Sox9 se expresa en el primordio tiroideo y en el mesénquima circundante durante el desarrollo embrionario	91
Sox9 se expresa en las células foliculares de tiroides bajo la regulación de la TSH y el TGFβ..	92
Los factores de transcripción tiroideos FoxE1 y Pax8 regulan la expresión de Sox9	94
Sox9 está implicado en la regulación de su propia expresión y en la de FoxE1	96
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA.....	103
ANEXO	117

ABREVIATURAS

--	--

ABREVIATURAS

AC: Adenilato Ciclasa

Akt/PKB: Proteína quinasa B

ATP: Adenosin trifosfato

BMP: Proteína morfogénica ósea

BRAF: Homólogo B1 del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CBP: Proteína de unión a CREB

c-myc: Protooncogén de la familia myc

Co-Smad: Smad mediadora común

CRE: Elemento de respuesta a cAMP

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP

CREM: Modulador del elemento de respuesta a cAMP

CTCF: Factor de transcripción de unión a CCCTC

DAPI: 4-,6-diamidino-2-fenilindol

DEHAL: Dehalogenasa

DIO1: Desiodasa 1

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

DUOX1/2: Oxidasa dual uno y dos

Duoxa2: Factor de maduración oxidasa dual 2

E: Día embrionario

ERK: Quinasa regulada extracelularmente

ELK1: Proteína con dominio ETS 1

EMSA: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética

ESC: Células madre embrionarias o “embryonic stem cells”

Fgf: Factor de crecimiento de fibroblastos

Fgf-R: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos

FoxE1: Factor de transcripción “Forkhead box E1”, también conocido como TTF2 de factor de transcripción tiroideo 2

FoxO1: Factor de transcripción “Forkhead box O” 1

GAP: Proteína activadora de GTP-asas

GFP: Proteína verde fluorescente

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GSK3 β : Glicogeno sintasa quinasa 3 β

GUS: β -glucuronidasa

HAT: Histona Acetil-transferasa

HDAC: Histona Deacetilasa

Hhex: Hematopoietically-expressed homeobox protein

HMG: Dominio de unión a DNA del tipo “Grupo de Alta Movilidad”

IGF1: Factor de crecimiento similar a insulina 1

IGF1R: Receptor del factor de crecimiento similar a insulina

iPSCs: Células madre pluripotentes inducidas o “induced pluripotent stem cells”

IRE: Insuline responsive elements

IRS-1/2: Sustrato del receptor de insulina-1 y 2

KO: Knockout

LIF: Factor inhibidor de leucemia

MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos

MCT8: Transportador de monocarboxilatos 8

MEK: MAPK/ERK quinasa

mTOR: Diana de rapamicina de mamíferos

NF1: Factor nuclear 1

NIS: Simportador de Sodio/Iodo

Nkx2-1: Factor de transcripción “homeobox” también conocido como TTF1 de factor de transcripción tiroideo 1

NUE: NIS upstream enhancer

Oct4: Factor de transcripción “octamer-binding 4”

Oligo R: Oligonucleótido relacionado

Oligo NR: Oligonucleótido no relacionado

p27KIP: Proteína inhibidora de CDK2/4

Pax8: Factor de transcripción “Paired box8”

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PKD: quinasa dependiente de 3'-fosfoinositidos-1

PI3K: Fosfatidil-inositol 3'-quinasa

PIP2: Fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato

PIP3: Fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato

PKA: Proteína quinasa dependiente de cAMP

PP1: Proteína fosfatasa-1

PP2A: Proteína fosfatasa-2A

PTEN: Fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma 10

qPCR: PCR cuantitativa

Rap1: Proteína próxima a Ras-1

Ras: GTPasa pequeña

R-Smad: Proteínas Smad reguladas por el receptor

RT: Reacción de retro transcripción

SBE: Elemento de unión a proteínas Smad

S.D: Desviación estándar

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico

Shc: Proteína con dominio SH2

Shh: Homólogo Sonic hedgehog

SOS: Proteínas de la familia “Son of sevenless”

Sox: Familia de factores de transcripción con dominio HMG

Sp1: Proteína de especificidad 1

TAZ: Co-activador transcripcional con dominio PDZ

T3: Triyodotironina

T4: Tiroxina

Tg: Tioglobulina

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta

TPO: Tiroperoxidasa

TRβ I y II: Receptor de TGFβ I y II

TRH: Hormona liberadora de tirotropina

TSH: Hormona estimulante del tiroides, hormona tirotropa o tirotropina

TSHR: Receptor de la hormona estimulante del tiroides

Txn: Tiorredoxina

TxnRd: Tiorredoxina reductasa

UR: Unidades relativas

INTRODUCCIÓN



1-. La glándula tiroides

1.1-. Morfología

El tiroides es una glándula endocrina formada por dos tipos celulares, las células C productoras de calcitonina y las células epiteliales o foliculares que tienen como función principal la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Estas hormonas se caracterizan por ser las únicas hormonas iodadas en vertebrados, de ahí que la capacidad de captar y almacenar yodo sea una de las características que definen la función tiroidea (De Felice and Di Lauro 2004). Las células C representan el 10% de la población celular y las foliculares el 90%. La glándula tiroides fue identificada en 1659 por el anatomista Thomas Wharton y se encuentra en la región anterior del cuello sobre el cartílago cricoides. Está formada por dos lóbulos situados a ambos lados de la tráquea unidos entre sí por una región conocida como istmo. Las hormonas tiroideas regulan la proliferación y diferenciación en diversos tipos celulares y participan en procesos como el crecimiento, homeostasis y desarrollo en multitud de tejidos diana (Pascual and Aranda 2013).

La capacidad celular de captar e incorporar yodo en los residuos de tirosina ha sido fundamental desde un punto de vista evolutivo, debido a la escasez de este elemento en el medio ambiente. Se ha descrito esta capacidad en organismos invertebrados primitivos como urocordados y cefalocordados. Estos organismos presentan un órgano análogo al tiroides conocido como endostilo y cuya función es la producción de una mucosidad compuesta por glicoproteínas iodadas que ayuda a la ingestión de alimentos y que presentan un alto contenido en yodo (Dunn 1980; Ogasawara et al. 1999). Los vertebrados más primitivos que presentan un órgano de estructura homóloga al tiroides de mamíferos son los peces agnatos. Se ha estudiado ampliamente el caso del ammocete o larva de lamprea (Suzuki and Kondo 1973). Este organismo presenta una glándula debajo de la faringe conocida como glándula subfaringea que tiene la capacidad de captar yodo y producir T3 y T4. Curiosamente, durante la metamorfosis esa glándula pierde el contacto con la faringe, momento en el cual se forma la estructura folicular típicamente tiroidea (Fig.-1), que se compone de una monocapa de células epiteliales, conocidas como células foliculares, dejando en su interior un espacio conocido como coloide (Wright and Youson 1976). En peces osteíctios o peces con hueso, la glándula subfaringea no está encapsulada y se puede observar que los folículos tiroideos se agrupan en forma de racimo a lo largo de todo el cuerpo del animal. En los peces cartilaginosos se puede observar que la glándula está encapsulada y es a partir de las aves

INTRODUCCIÓN

cuando la glándula tiroidea adopta la estructura bilobulada que se observa en el tiroides de mamíferos (Krude 2014).

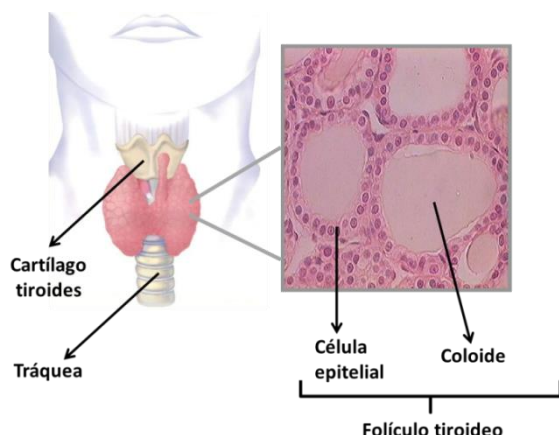


Figura 1. Estructura y morfología de la glándula tiroides. Panel izquierdo: Estructura bilobulada de la glándula tiroides situada sobre la tráquea. Panel derecho: Estructura del folículo tiroideo humano teñido con hematoxilina-eosina observado con microscopio óptico con un objetivo 20X.

1.2-. Fisiología de la célula folicular tiroidea: Síntesis de las hormonas tiroideas

La síntesis y secreción de las hormonas tiroideas es la función principal de la glándula tiroides y para ello es necesario incorporar yodo desde el torrente sanguíneo al interior de la célula folicular, ya que este elemento es el componente fundamental de las hormonas tiroideas. En la membrana basolateral de la célula folicular se localiza el simportador Na^+/I^- (NIS) (Dai et al. 1996) proteína responsable de la captación de yodo por la célula tiroidea mediante un transporte activo catalizado por el gradiente de concentración de Na^+ . El yodo es transportado hasta la membrana apical, donde a través de otra proteína transportadora denominada pendrina (Yoshida et al. 2004), pasará al coloide donde se incorporará a los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg), proteína precursora de las hormonas tiroideas. Esta proteína es sintetizada en el interior de los tirocitos y secretada al lumen del folículo, donde constituye el componente mayoritario del coloide (Degroot and Niepomnische 1977). Para la incorporación del yodo a la Tg es necesaria su oxidación por el enzima tiroperoxidasa (TPO) y la generación de agua oxigenada por las oxidasas Duox1/2 (De Deken et al. 2002). La Tg una vez iodada es endocitada al interior de la célula folicular tiroidea mediante un proceso de pinocitosis, donde por la acción de enzimas lisosomales es proteolizada dando lugar a las T4 y T3 que son secretadas al torrente sanguíneo a través del transportador MCT8 (Di Cosmo et al. 2010) (Fig. 2). Fruto de la proteólisis de la Tg se obtienen mono y diiodotironina, que son deshalogenadas por la acción de la enzima DEHAL para reciclar el yodo. Este mecanismo enzimático de recuperación y reciclaje del yodo es fundamental, teniendo en cuenta la escasez de este elemento en el medio ambiente.

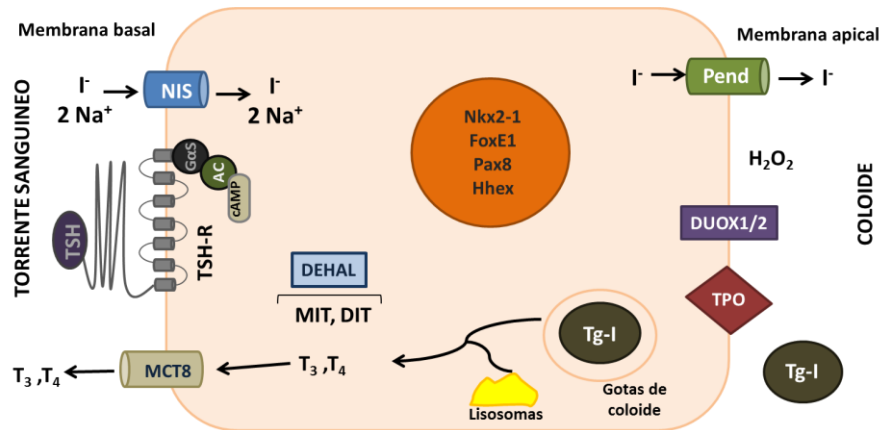


Figura 2.- Representación esquemática de la célula folicular tiroidea y de las proteínas implicadas en la síntesis de las hormonas tiroideas. AC: Adenilato Ciclasa, DEHAL: Dehalogenasa, DIT: Diiodotironina, DUOX: Oxidasa dual, NIS: Simportador de Na⁺/I⁻, MIT: Monoiodotironina, MCT8: Siglas en inglés de Monocarboxylate Transporter 8, T₃: Triiodotironina, T₄: Tiroxina, Tg: Tiroglobulina, TPO: Tiroperoxidasa, TSH: Tirotropina, TSH-R: Receptor de tirotropina.

La síntesis y secreción de las hormonas tiroideas está controlada por la hormona estimuladora del tiroides, tirotropina o TSH, que es producida en la hipófisis (Fig. 3). La producción de TSH está a su vez regulada de forma positiva por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), secretada por el hipotálamo (May and Donabedian 1973). Mediante un mecanismo de *feedback* negativo, la TSH inhibe la síntesis del TRH en el hipotálamo (Shenkman et al. 1973). La TSH, que es la principal señal extracelular que controla la actividad de los tirocitos, regula la expresión de los genes de diferenciación tiroideos (TPO, Tg, NIS y el receptor de TSH, TSH-R) necesarios para la síntesis de las hormonas tiroideas.

Este proceso ocurre a través de un conjunto de factores de transcripción (Nkx2-1, Pax8 y FoxE1) que solo se expresan conjuntamente en las células foliculares del tiroides (Fernandez et al. 2015).

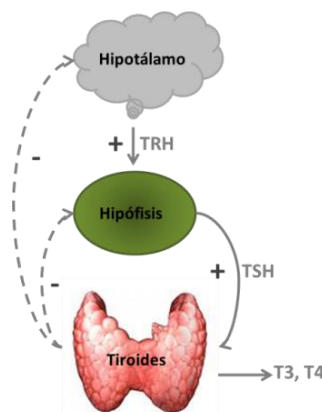


Figura 3.- Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. TRH: Hormona liberadora de TSH producida por el hipotálamo. TSH: Hormona estimuladora de tiroides producida por la hipófisis. T₃ y T₄: Hormonas tiroideas producidas por el tiroides. Las líneas continuas simbolizan activación. Las líneas punteadas significan inhibición.

2-. Vías de señalización implicadas en la función tiroidea

2.1-. Tirotropina (TSH)

La TSH, hormona glicoproteica secretada en el lóbulo anterior de la hipófisis, es el principal regulador de la proliferación y función de la célula folicular tiroidea. Se compone de dos subunidades, alfa y beta, unidas no covalentemente (Pierce and Parsons 1981). El receptor de TSH (TSH-R) es una proteína de 7 dominios transmembrana acoplada a proteínas G heterotriméricas presente en la membrana basal de las células foliculares del tiroides. La TSH tras su unión al TSH-R, a través de la subunidad beta, regula la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Vassart and Dumont 1992). La activación del TSH-R provoca la liberación de las proteínas G, tanto $G\alpha$ como $G\beta\gamma$. La liberación de las proteínas $G\alpha$ induce la activación de la adenilato ciclasa que aumentará los niveles intracelulares de cAMP a partir de ATP (Dumont 1971; Calebiro et al. 2009). Este aumento del cAMP es el principal mecanismo a través del cual se controla el crecimiento y la proliferación de la célula folicular tiroidea (Ledent et al. 1992). El efecto del cAMP se produce principalmente mediante la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), que tras la unión de dos moléculas de cAMP a cada subunidad reguladora libera las subunidades catalíticas que difunden hasta el núcleo donde fosforilan al factor de transcripción CREB en el residuo de Serina 133 (Cass et al. 1999) (Fig.-4). Esta fosforilación específica va a favorecer su unión a los elementos de respuesta a cAMP (CRE) presentes en los promotores de sus genes diana, así como a cofactores del tipo histonas-acetil-transferasas como la proteína de unión a CREB (CBP) (Chrivia et al. 1993; Kwok et al. 1994). La actividad transcripcional de CREB disminuye debido a su desfosforilación mediada por la acción de las fosfatasa PP1 y PP2A (Lazzereschi et al. 1997). Se ha descrito que otros factores de transcripción de la familia de factores de respuesta a cAMP diferentes a CREB, como CREM, se unen a los sitios CRE presentes en los promotores de diversos genes regulando su expresión como ocurre en el caso de NIS (Fenton et al. 2008). La vía de señalización de TSH mediada por cAMP y la consecuente activación de CREB es fundamental para el mantenimiento del estado diferenciado de la célula folicular y por consiguiente para el correcto funcionamiento del tiroides. Esto se ha podido observar en ratones en los que se ha suprimido la expresión de CREB de forma específica en el tiroides. Estos ratones presentan una estructura folicular anormal y sin expresión de ninguna de las proteínas específicas de tiroides (Nguyen et al. 2000). Se ha descrito que la TSH regula la expresión de los factores de transcripción tiroideos como Pax8 (Medina et al. 2000) o FoxE1 (Ortiz et al. 1997). En el caso de Nkx2-1 se ha demostrado que la TSH no está regulando su expresión en el tiroides (Van Renterghem et al. 1995). Sin embargo, la TSH induce la unión de Pax8 y Nkx2-1 a sus sitios consenso en los promotores de sus genes diana mediante un mecanismo dependiente del estado redox de estos factores de transcripción (Kambe

et al. 1996). En el caso de Pax8 se ha descrito que su capacidad de unión a su sitio consenso en el promotor de NIS depende de la reducción de dos residuos de cisteína altamente conservados en todas las proteínas de la familia Pax: Cys-45 y Cys-57 (Cao et al. 2002). La endonucleasa Ape1 (también conocida como Ref-1), cuya expresión es dependiente de TSH, junto con la tioredoxina (Txn) y la tioredoxinas reductasas (TxnRd1, 2 y 3) son las principal enzimas responsables de la reducción de Pax8 (Tell et al. 1998) y por consiguiente de la activación de la capacidad de unión de Pax8 al DNA mediante un mecanismo dependiente de selenio (Leoni et al. 2016). A través de la unión de estos factores de transcripción tiroideos a los sitios consenso presentes en sus promotores, la TSH, vía AMPc, controla la expresión de marcadores de tiroides como TPO, NIS o Tg, a pesar de que carecen de sitios CRE en las secuencias de sus respectivos promotores. (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993; Zannini et al. 1997; Ohno et al. 1999; Espinoza et al. 2001; Mariani et al. 2002; Postiglione et al. 2002; Fernandez et al. 2013).

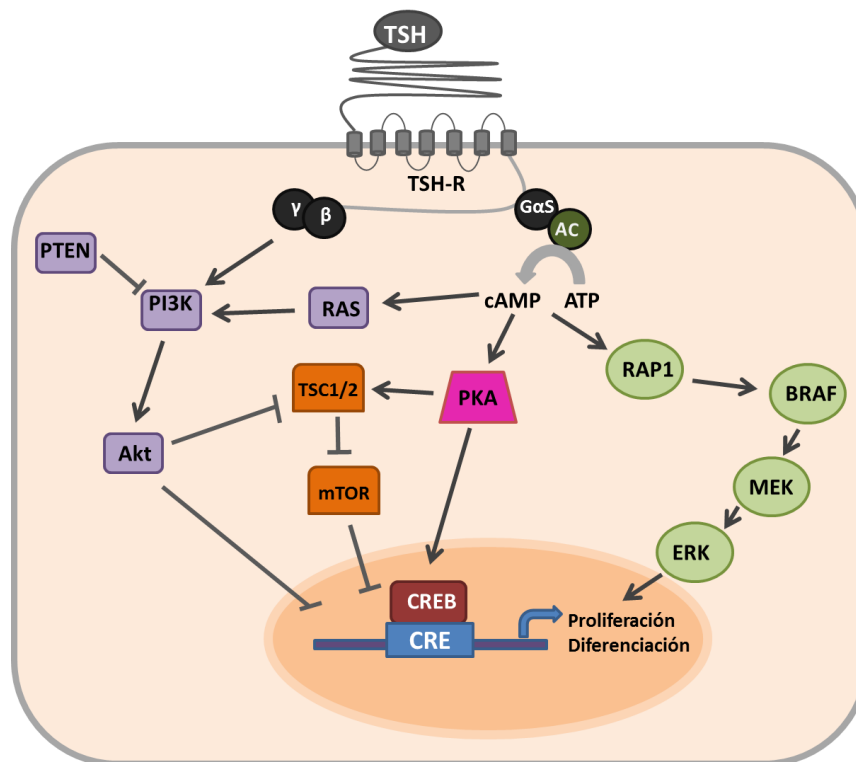


Figura 4. Vías de señalización activadas por TSH en la célula folicular tiroidea. La unión de TSH a su receptor induce la disociación de las proteínas G ($G\alpha$ y $G\beta\gamma$) del TSH-R, siendo la vía principal de acción la de $G\alpha$, que activa la adenilato ciclasa (AC) aumentando los niveles del segundo mensajero cAMP a partir de ATP. El cAMP activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) que fosforila al factor de transcripción CREB induciendo su translocación al núcleo donde se unirá a los secuencias de respuesta a cAMP (CRE) presentes en los promotores de sus genes diana. El cAMP puede también activar a la GTPasa RAP1, que induce la activación de la vía de las MAPK, así como la vía de PI3K a través de la activación de la GTPasa RAS. Por otro lado la subunidad $\beta\gamma$, activa la vía de la PI3K/Akt, que es inhibida por PTEN. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

Aparte de la activación de la vía de PKA/CREB, se ha descrito que a través de las proteínas $G\alpha$ s y el consecuente aumento de los niveles de cAMP, la TSH puede activar también la vía de las quinasas

INTRODUCCIÓN

ERK (Nellore et al. 2009) , mTOR1 (Brewer et al. 2007) y PI3K mediante la activación de la GTPasa RAS (Cass and Meinkoth 2000; Pham et al. 2000). Además del efecto mediado por el aumento de los niveles de cAMP inducido por la liberación de las proteínas $G\alpha_s$, la TSH induce también la liberación de los dímeros $\beta\gamma$ tras la unión a su receptor, lo que se traduce en una activación de la vía PI3K/Akt (Fig.-4). La activación de esta vía contrarresta homeostáticamente el efecto inducido por el aumento de los niveles de cAMP, como ocurre en el caso de NIS (Zaballos et al. 2008). En su conjunto, todas estas vías de señalización activadas por la TSH evidencian que el efecto de esta hormona sobre el crecimiento y la proliferación de la célula folicular tiroidea ocurre a través de una compleja red de comunicación cruzada entre estas diferentes vías de señalización y sus diversos efectores (Medina and Santisteban 2000).

El papel del TSH-R y la señalización por la TSH durante el desarrollo embrionario del tiroides es limitado, ya que se ha descrito que ratones que no expresan el TSH-R presentan una expresión normal de los factores de transcripción tiroideos durante el desarrollo y tienen un tiroides normal al nacer, aunque posteriormente se atrofia y se observa una disminución de los niveles de expresión de NIS y TPO (Postiglione et al. 2002).

2.2.- Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1)

Las células foliculares de tiroides requieren la acción del factor de crecimiento IGF1, que mediará su acción a través de su unión al receptor con actividad tirosina-quinasa (Isozaki et al. 1987). Tras la activación del receptor, la vía principal a través de la cual el IGF1 lleva a cabo su función en las células foliculares de tiroides es la de la quinasa lipídica PI3K, que es atraída a la membrana plasmática tras la fosforilación de IRS1 por el IGF1R activado (Saito et al. 2001). La activación de la PI3K induce la fosforilación de PIP2, lo que da lugar al segundo mensajero PIP3. La reacción inversa es catalizada por la fosfatasa PTEN (Fig.-5). El efector final de esta vía, la proteína quinasa B o Akt, se fosforila en dos residuos específicos que activan su función (Chan et al. 1999; Sarbassov et al. 2005), que se ejerce sobre múltiples dianas activando diversos procesos celulares como la proliferación. Este proceso tiene lugar a través de la fosforilación y consecuente inhibición de FoxO1, $p27^{kip}$, la quinasa GSK3 (Cross et al. 1995; Brunet et al. 1999; Shin et al. 2002) o la síntesis de proteínas mediante la activación de mTOR1 (Scott et al. 1998). Además de la vía de PI3K/Akt, la activación del IGF1R induce la unión de Shc (Ariga et al. 2000), que mediante su interacción con las proteínas Grb2 y SOS activa las GTPasas RAS. Esto se traduce en la activación de la vía de las MAPK, lo cual estimula la proliferación celular (Fig.-5).

Cuando se inactiva el receptor de IGF1 se ha demostrado que son necesarias dosis mayores de TSH para mantener el estado diferenciado y la función del tiroides (Muller et al. 2011). Además, en

ratones que presentan una sobre-expresión del receptor de IGF1 se ha observado hiperplasia, lo que corrobora el papel de IGF1 en el crecimiento y proliferación de la célula folicular tiroidea (Clement et al. 2001). El papel de IGF1 en la diferenciación de la célula folicular tiroidea es limitado, aunque se ha observado que ejerce un efecto sinérgico con la TSH en la regulación de la expresión de Tg (Santisteban et al. 1987), TPO (Zarrilli et al. 1990) y FoxE1 (Ortiz et al. 1997), mientras que en el caso de NIS se ha descrito que inhibe a través de un mecanismo dependiente de la vía de PI3K la activación de su expresión inducida por TSH (Garcia and Santisteban 2002).

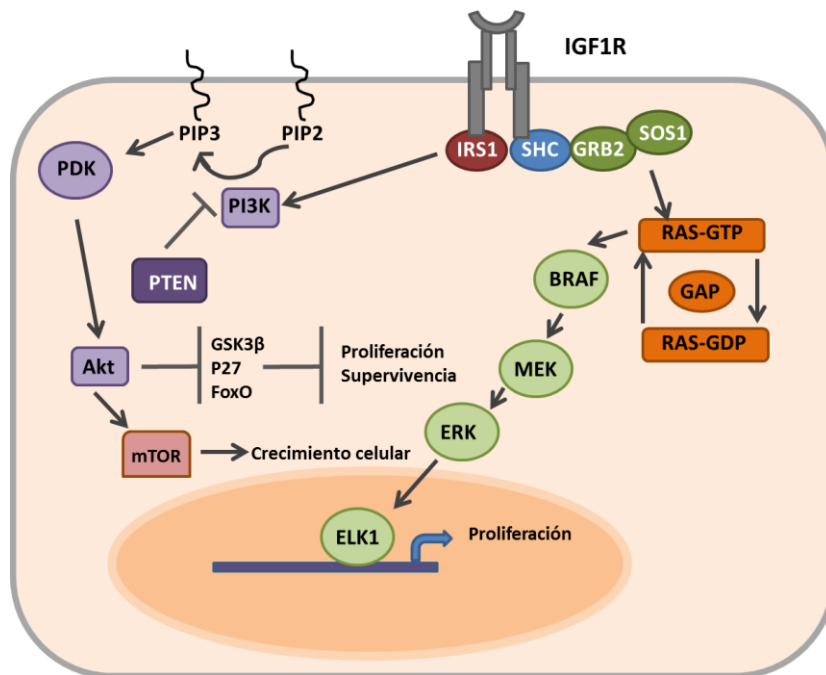


Figura 5. Vías de señalización activadas por IGF1 en la célula folicular tiroidea. La activación del receptor de IGF1 (IGF1R) induce, mediante su actividad tirosina-quinasa, el reclutamiento del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) que promueve la activación de la enzima fosfoinositol 3'-quinasa (PI3K). Esta enzima fosforila al fosfoinositol-3,4 bisfosfato (PIP2) dando lugar al segundo mensajero fosfoinositol trifosfato (PIP3). La fosfatasa PTEN lleva a cabo la reacción opuesta. PIP3 recluta a la proteína quinasa B (Akt) y a la quinasa dependiente de 3'-fosfoinositído-1 (PDK), produciéndose la activación de Akt. La activación del IGF1R induce también el reclutamiento de SHC, que llevará a la activación de RAS mediante el reclutamiento de Grb2 y SOS, produciéndose la activación de la cascada de las MAPKs. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

2.3-. Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)

La vía de señalización de TGFβ regula diversos procesos como desarrollo, supervivencia celular o diferenciación. Dependiendo del tipo celular o de las condiciones fisiológicas, los efectos del TGFβ pueden ser muy variados, pudiendo ser incluso opuestos en muchos casos. Además esta citoquina está implicado en patologías de diversa índole como el cáncer o enfermedades autoinmunes (Massague 2012). Esta superfamilia de factores de crecimiento incluye otras proteínas con estructura similar como las activinas, las proteínas Nodal o las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), siendo TGFβ1 el primer miembro de esta familia descrito (Derynck et al. 1985; Morikawa et al. 2016). Esta citoquina ejerce su función a través de la unión a un receptor de tipo II (TRβII) que,

INTRODUCCIÓN

tras el reclutamiento de un receptor tipo I (TR β I), y gracias a su actividad serina-tirosina quinasa, induce la fosforilación de las Smads reguladas por el receptor (R-Smad) Smad2 y 3, que se traslocan al núcleo unidas a la Smad mediadora común (Co-Smad) Smad4 formando un complejo trimérico formado por dos R-Smads y una Co-Smad (Fig.-6). La fosforilación de las R-Smad y su consecuente translocación al núcleo es inhibida por la Smad7 (Fig.-6). Tras la translocación al núcleo, este complejo se va a unir a los elementos de unión de Smad (SBEs) que presentan la secuencia 5'-GTCT-3' o su complementario 5'-AGAC-3' presentes en las regiones promotoras de sus genes diana regulando su expresión (Shi and Massague 2003). Así mismo, las proteínas Smads pueden unirse a secuencias que difieren de las SBE, conocidas como elementos inhibitorios de TGF β (TIE) y cuya secuencia es 5'-GGCTT-3' (Massague et al. 2005). Las proteínas Smad pueden, según el gen diana del que se trate, activar o reprimir su expresión. La activación de la expresión génica mediada por las Smads requiere el reclutamiento de histonas acetil transferasas (HATs) que remodelen la cromatina y permitan su transcripción. Por el contrario, la represión de la expresión génica mediada por las Smads necesita el reclutamiento de histonas deacetilasas (HDACs) que inducirán la compactación de la cromatina inhibiendo así la activación de la transcripción del gen en cuestión (Massague 2012).

La célula folicular tiroidea expresa TGF β y sus receptores I y II, por lo que se ha descrito que este factor de crecimiento está involucrado en el control del crecimiento y la función tiroidea (Roger 1996; Carneiro et al. 1998). Numerosos estudios han demostrado que, en condiciones normales, TGF β inhibe diferentes procesos en la célula folicular tiroidea como la proliferación (Cirafici et al. 1992) o la diferenciación, mediante la inhibición de la expresión de Tg, TSH-R y NIS (Pekary and Hershman 1998; Nicolussi et al. 2003). En el caso de la represión de la expresión de NIS y Tg por TGF β se ha descrito que está mediada por la reducción de la expresión de Pax8 y por la inhibición de la unión de este factor de transcripción a su secuencia consenso en los respectivos promotores de Tg y NIS (Kang et al. 2001; Costamagna et al. 2004). Sin embargo, se ha descrito que en carcinomas papilares de tiroides, el tipo de tumor tiroideo más frecuente, TGF β promueve el crecimiento tumoral. En este tipo de carcinomas existe una sobreexpresión de TGF β , lo que se traduce en un aumento en la expresión de p27 y ciclina D1, lo que promueve la proliferación y, por consiguiente, el crecimiento tumoral (Garcia-Rendueles et al. 2017).

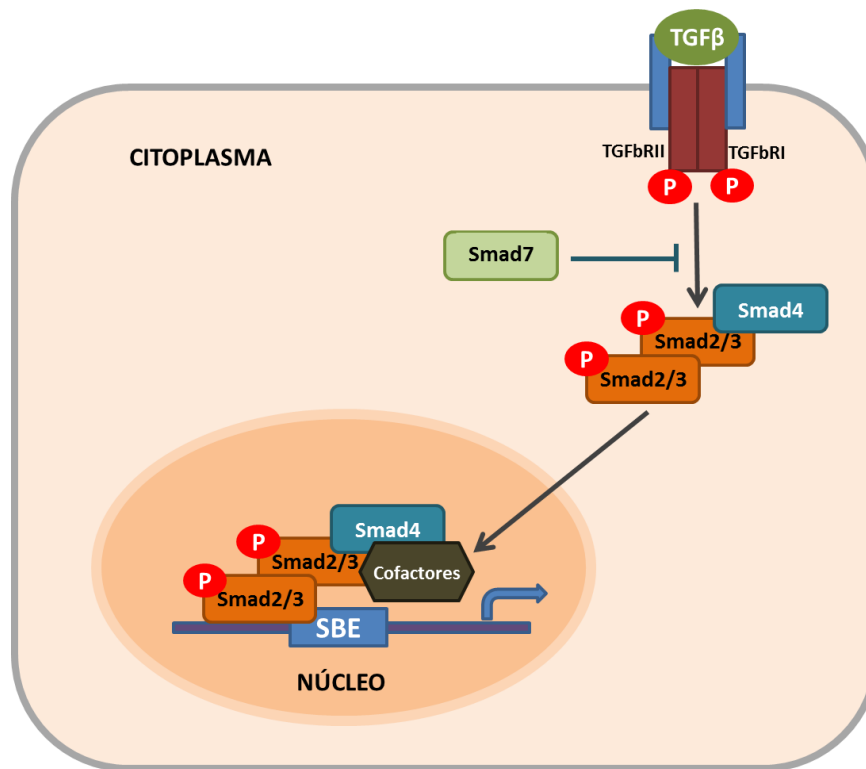


Figura 6. Vía de señalización de TGFβ. La unión del factor de crecimiento transformante beta al receptor induce la fosforilación de Smad2 y Smad3 lo que se traduce en la unión de Smad4. Este complejo trimérico se trasloca al núcleo donde se unirá a las secuencias consenso SBE presentes en los promotores de sus genes diana gracias a la cooperación de cofactores que se unen al complejo Smad2/3 y Smad4. Smad7 tiene un efecto inhibitorio sobre la activación de la vía. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

3.-Factores de transcripción tiroideos

Los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8, FoxE1 y Hhex definen la identidad folicular tiroidea durante el desarrollo embrionario, ya que es el único tipo celular presente en el organismo en el que se da una expresión conjunta de estos cuatro factores de transcripción (Damante et al. 2001). Así mismo, estos factores de transcripción son esenciales para mantener el fenotipo tiroideo diferenciado y el correcto funcionamiento de la célula folicular tiroidea en el tiroides adulto. Los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 fueron inicialmente identificados a través de sus sitios de unión a los promotores de las proteínas de diferenciación tiroideas como Tg, TPO, TSH-R o NIS (Damante and Di Lauro 1994; Ohno et al. 1999) (Fig.-7). Sin embargo, la unión de Hhex a los promotores de los genes tiroideos ha sido menos estudiada (Pellizzari et al. 2000), por lo que esta tesis no se tendrá en cuenta tan en detalle al factor de transcripción Hhex.

INTRODUCCIÓN

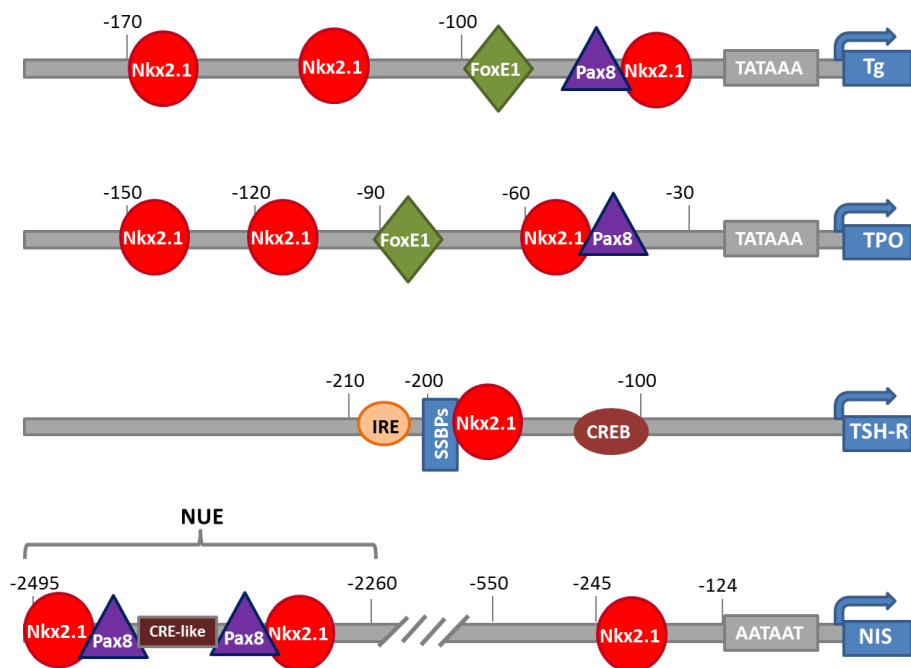


Figura 7. Representación esquemática de los sitios de unión de diferentes factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 a los promotores de los genes tiroideos Tg, TPO, TSHR y NIS. NUE hace referencia a las siglas en inglés "NIS Upstream Enhancer".

3.1-. Nk2 Homeobox 1 (Nkx2-1)

Inicialmente conocido como Thyroid Transcription Factor 1 (TTF1), es un factor de transcripción que contiene un homeodominio conservado de 17 aminoácidos que se expresa en la célula folicular tiroidea (Civitareale et al. 1989) y en las células C (Suzuki et al. 1998). Se ha descrito su expresión en otros tejidos como pulmón (Ikeda et al. 1995) o en los ganglios basales (Nakamura et al. 2001). Los ratones generados por manipulación genética con expresión nula de Nkx2-1 mueren a las pocas horas de nacer, debido a la ausencia de pulmones (Kimura et al. 1996). En cuanto al fenotipo del tiroides, se observa que a E8.5 las células del endodermo faríngeo de estos ratones dan lugar a los precursores tiroideos, que, sin embargo, posteriormente remiten y desaparecen por apoptosis en torno al día 12 de desarrollo embrionario (Kimura et al. 1999). Por ello se ha propuesto que Nkx2-1 juega un papel fundamental en la supervivencia de las células precursoras del tiroides y no tanto en la especificación de las mismas. En ratones en los que la expresión de Nkx2-1 se ha inhibido en etapas más tardías del desarrollo embrionario se observa una estructura anormal de los folículos tiroideos, por lo que se ha concluido que Nkx2-1 presenta una importante función en el mantenimiento de la arquitectura tisular y la supervivencia celular en el tiroides adulto (Kusakabe et al. 2006). Resultados en el mismo sentido se han descrito para el caso del pulmón, donde la expresión de Nkx2-1 no es esencial para la especificación de los neumocitos derivados del endodermo para formar el pulmón, pero si para la correcta diferenciación de dichas células pulmonares y la formación de las estructuras alveolares (Costa et al. 2001). Sin embargo,

trabajos recientes usando como modelo celular mESCs han descrito que la expresión temporal de Nkx2-1 en progenitores endodérmicos derivados de las mESCs es suficiente para la especificación de estos progenitores a células con características foliculares y para inducir la expresión de marcadores de tiroides como Tg, NIS o TSH-R, lo que puede sumar importancia al papel de Nkx2-1 en la especificación tiroidea durante el desarrollo embrionario (Dame et al. 2017). Los mecanismos y señales moleculares implicados en el control de la expresión de Nkx2-1 al inicio del desarrollo han sido poco estudiados hasta la fecha. Se ha descrito que genes con un papel importante en el desarrollo tiroideo, como es el caso de los genes Hoxa, controlan la expresión *in vitro* de Nkx2-1 (Guazzi et al. 1994). Conocer los genes que regulan la expresión de Nkx2-1 durante la especificación tiroidea, así como profundizar en el estudio de los genes diana de este factor de transcripción en el tiroides adulto puede arrojar importante información acerca del papel de Nkx2-1 en el desarrollo, diferenciación y supervivencia de la célula folicular tiroidea.

3.2-. Paired box gene 8 (Pax8)

Pax8 fue inicialmente descrito en el tiroides y en el sistema excretor (Plachov et al. 1990). Así mismo se ha descrito su expresión en otros muchos tejidos como las células epiteliales de endocervix, el ovario o las trompas de Falopio (Ozcan et al. 2011; Riesco-Eizaguirre et al. 2014). Contiene dos dominios de unión a DNA de los tipos *paired-box* y homeodominio (Bopp et al. 1986). Se ha descrito que los sitios de unión de Pax8 en los promotores de Tg y TPO solapan con los de Nkx2-1 (Fig.4) cooperando a la hora de activar la expresión de sus genes diana, como en el caso de Tg (Di Palma et al. 2003). En el endodermo de embriones de ratón solo se observa expresión de Pax8 en los precursores tiroideos, coincidiendo con la expresión de Nkx2-1 en la especificación a día 8.5 de gestación. El papel de Pax8 en el desarrollo embrionario de tiroides se ha estudiado usando como modelo ratones KO para Pax8. En estos embriones la especificación tiroidea tiene lugar con normalidad, observándose células con expresión de Nkx2-1, aunque con expresión reducida de FoxE1 y Hhex. Sin embargo, en torno a E11.5, no ocurre la expansión lateral que tiene lugar en el ratón silvestre y las estructuras foliculares desaparecen, por lo que se observa un tiroides hipoplásico en el que no se detecta expresión de proteínas específicas de tiroides como Tg o TPO. Estos ratones presentan otros problemas asociados como infertilidad y solo el 20% sobreviven más allá de las tres semanas tras el nacimiento debido a un problema de hipotiroidismo profundo, aunque no presentan problemas renales dado que la expresión de otros genes Pax compensa la ausencia de Pax8 (Mansouri et al. 1998; Wistuba et al. 2007). En ratones que no expresan Pax8 los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2 en tiroides están reducidos, por lo que aumenta el número de células en apoptosis (Fagman et al. 2011; Fagman and Nilsson 2011). Así mismo, recientemente en nuestro laboratorio se ha descrito el papel

fundamental de Pax8 en el establecimiento de la polaridad de la célula folicular tiroidea y la foliculogénesis a través de la regulación transcripcional de Cadherina-16 (Koumarianou et al. 2017). En base a estas evidencias se puede afirmar que Pax8 no es imprescindible para la especificación tiroidea, aunque tiene un papel fundamental en la supervivencia celular y en la regulación transcripcional de genes implicados en la diferenciación celular tiroidea y en la foliculogénesis (Pasca di Magliano et al. 2000; Koumarianou et al. 2017).

3.3-. Forkhead box protein E1 (FoxE1)

Anteriormente conocido como Thyroid Transcription Factor 2 (TTF2), el factor de transcripción FoxE1 contiene un dominio de unión a DNA de la familia *Forkhead* (Zannini et al. 1997). Se identificó inicialmente como mediador de la regulación hormonal de la expresión de sus genes diana Tg y TPO en cuyos promotores se habían identificado sitios consenso para FoxE1 (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993; Ortiz et al. 1997). FoxE1 es considerado un factor pionero (Zaret and Carroll 2011), ya que como tal tiene la capacidad intrínseca de abrir la cromatina compactada para permitir la unión de otros factores de transcripción que activen la expresión de sus genes diana (Cuesta et al. 2007). Además de en el tiroides, se ha descrito expresión de FoxE1 en otros tejidos, como en testículos y epidermis (Clifton-Bligh et al. 1998; Eichberger et al. 2004). Durante el desarrollo embrionario, FoxE1 se expresa en tejidos que derivan de los arcos y la pared faríngea, como el paladar o el esófago. Además se ha descrito su expresión en tejidos derivados del ectodermo como la hipófisis anterior o los folículos pilosos (Dathan et al. 2002). Debido a la gran variedad de tejidos donde se detecta su expresión durante el desarrollo embrionario, se le ha dado una menor importancia en la especificación tiroidea, aunque al igual que en el caso de Pax8 y Nkx2-1, se detecta su expresión en el primordio tiroideo en E8.5 (Parlato et al. 2004). Ratones KO para FoxE1 han servido como modelo para estudiar su función en la organogénesis. La falta de expresión de FoxE1 no impide el nacimiento con vida de los ratones que, sin embargo, mueren aproximadamente a los dos días debido a que presentan un fenotipo severo de paladar hendido. En cuanto al fenotipo tiroideo de estos ratones se pueden observar dos situaciones: Un 50% de los ratones presentan agenesia total de tiroides y en el otro 50% de los casos se observa un tiroides ectópico, normalmente con posición sublingual (De Felice et al. 1998). En estos tiroides ectópicos se ha observado expresión de Tg, lo que indica que FoxE1 no es imprescindible para la especificación tiroidea ni para que llegue a término la correcta diferenciación de la célula folicular. La recuperación de la expresión de FoxE1 en los precursores de las células tiroideas durante el desarrollo en ratones *knockout* para este factor de transcripción da lugar a que el tiroides alcance su posición correcta, por lo que se ha propuesto que el papel principal de FoxE1 durante el desarrollo embrionario de tiroides sea el control de los procesos de

migración de los precursores tiroideos hacia su posición definitiva en la región anterior del cuello a ambos lados de la tráquea (Fagman et al. 2006).

3.4-. Haematopoietically-expressed homeobox protein (Hhex)

El factor de transcripción Hhex, inicialmente descrito en las células hematopoyéticas, contiene un dominio Homeobox conservado de unión a DNA de 60 aminoácidos de longitud (Crompton et al. 1992). Además de en el tiroides, se ha descrito una elevada expresión de Hhex en el hígado adulto. Así mismo, durante el desarrollo se ha detectado expresión de Hhex en timo, pulmones, hígado o páncreas, por lo que se le atribuyó un papel importante en el desarrollo de órganos derivados del endodermo (Bogue et al. 2000). Los ratones *knockout* para Hhex presentan una gran variabilidad fenotípica. En los casos más severos, no sobreviven más allá del día 15.5 de gestación y presentan agenesia de tiroides sin expresión de FoxE1 ni Nkx2-1 o un tiroides hipoplásico conectado con la faringe en el cuál si se detecta expresión de Pax8, Nkx2-1 y FoxE1. Por ello, y unido a que se detectan problemas de desarrollo en otros órganos derivados del endodermo, no se puede afirmar que Hhex juegue un papel fundamental en la especificación tiroidea (Martinez Barbera et al. 2000). En aquellos ratones KO para Hhex en los que la especificación tiroidea ocurre de forma normal, se observa una reducción de la expresión de Pax8 y FoxE1 en E10, así como una ectopia del tiroides localizándose unido a la faringe. Esto indica que, aunque Hhex no sea estrictamente necesario para la especificación tiroidea, sí que es fundamental para el mantenimiento de la expresión de Pax8 y FoxE1 necesaria para el correcto desarrollo tiroideo y para la movilidad y migración celular durante la organogénesis tiroidea (Parlato et al. 2004; Bort et al. 2006). En tiroides adulto se ha descrito que la TSH inhibe la expresión de Hhex, así como que Hhex inhibe la expresión de Tg. Además se ha descrito que Nkx2-1 y el propio Hhex cooperan para activar el promotor de Hhex lo que, junto con lo descrito más arriba acerca del papel de Hhex en el mantenimiento de la expresión de Pax8 y FoxE1, nos permite concluir que Hhex es esencial para la morfogénesis tiroidea y el mantenimiento la expresión de los factores de transcripción tiroideos (D'Elia et al. 2002; Puppini et al. 2003).

3.5-. Interacción entre los factores de transcripción tiroideos

Los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8, FoxE1 y Hhex son necesarios para la correcta especificación, morfogénesis y diferenciación de la célula folicular tiroidea. En este sentido se ha descrito que existe un *loop* regulatorio en el que la expresión de los propios factores de transcripción y la de otros genes de diferenciación tiroideos está controlada por al menos uno de estos factores de transcripción tiroideos.

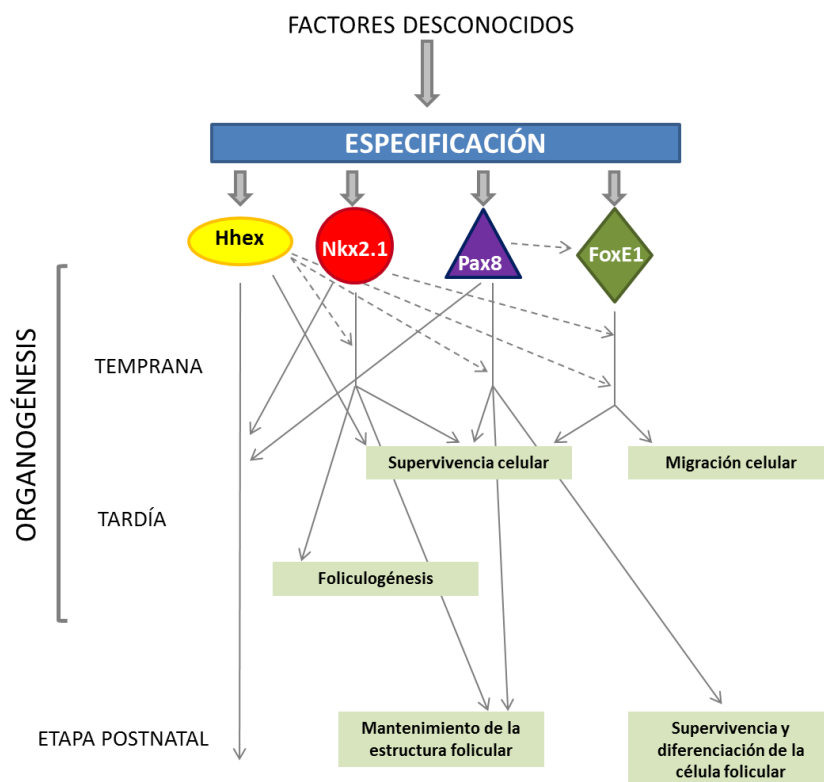


Figura 8. Red de conexiones entre los diferentes factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8, FoxE1 y Hhex y su implicación en los diferentes procesos implicados en la organogénesis, proliferación y diferenciación tiroidea. Se representa la relación de cada factor de transcripción durante la organogénesis en la supervivencia y migración de los precursores tiroideos así como en la foliculogénesis. Además, se indica el papel los factores de transcripción tiroideos en el mantenimiento de la estructura folicular tiroidea y en la supervivencia y diferenciación de la célula folicular en la etapa postnatal. Adaptada de De Felice M, Di Lauro R, 2011.

Durante la gestación, en la especificación tiroidea a E8.5 en ratones, solo la expresión de FoxE1 es dependiente de Pax8, ya que en el resto de los casos no hay disminución de la expresión por la ausencia de uno de los otros factores, como han demostrado los modelos de ratones *knockout* que se han generado para cada uno de los factores de transcripción (Fig-. 8). A E10, Pax8, Nkx2-1 y Hhex establecen una relación recíproca en la cual la expresión de cada uno de ellos está controlada por otro factor y los tres de forma conjunta controlan la expresión de FoxE1 (Parlato et al. 2004). Esta red de regulación transcripcional se mantiene también en la célula folicular diferenciada, en la cual la expresión de Hhex es controlada por Nkx2-1 y Pax8, siendo estos dos factores responsables de la supervivencia, proliferación y diferenciación de la célula folicular tiroidea así como del mantenimiento de la estructura del folículo. Por su parte FoxE1 es responsable de la migración de los precursores tiroideos hasta su posición definitiva durante el desarrollo embrionario (Fig-8). Así mismo, Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 participan de forma conjunta y cooperativa en la regulación de la expresión de las proteínas específicas de tiroides Tg, TPO, TSH-R y NIS así como otras proteínas necesarias para la síntesis de las hormonas tiroideas (Fig -. 9).

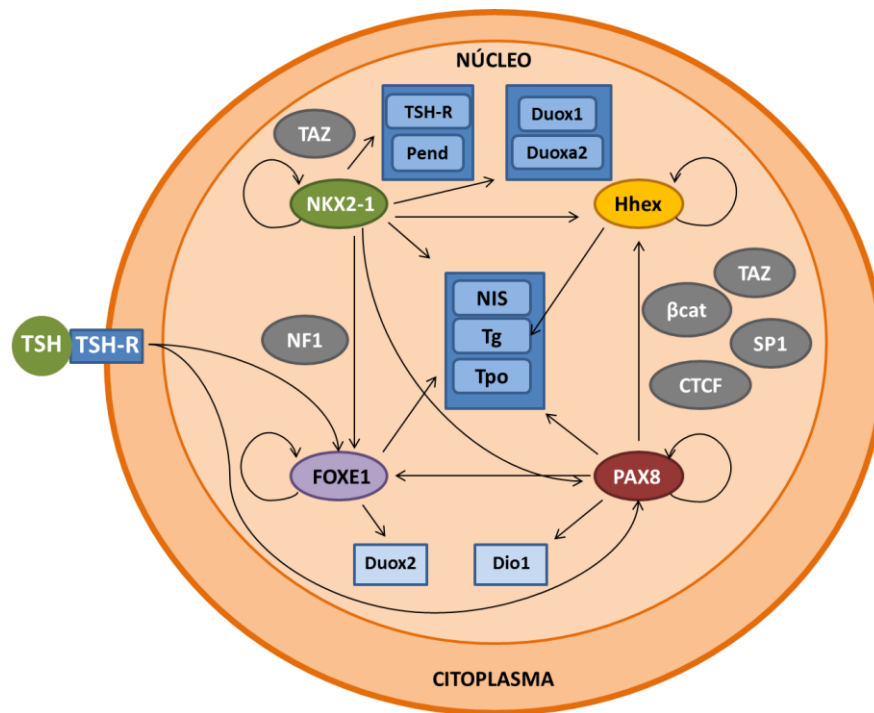


Figura 9-. Interacción entre los factores de transcripción tiroideos en la célula folicular diferenciada. La diferenciación de la célula folicular tiroidea está regulada por TSH. La expresión de Tg está regulada por los cuatro factores de transcripción tiroideos, mientras que la expresión de NIS y Tpo está regulada por Nkx2-1, Pax8 y FoxE1. El factor Nkx2-1 regula la expresión de los otros tres factores de transcripción, así como de TSH-R, Pendrina, Duox1 y Duoxa2. La actividad transcripcional de Nkx2-1 puede ser regulada por TAZ. La expresión de Duox2 es regulada por FoxE1, que en ocasiones coopera con NF1/CTF. Pax8 regula la expresión de FoxE1, Hhex y Dio1. Pax8 puede cooperar con βcatenina, TAZ, CTCF o SP1. Los cuatro factores de transcripción regulan su propia expresión. Los cofactores y proteínas que interaccionan con los factores de transcripción se muestran en gris. Las dianas transcripcionales de los factores de transcripción se muestran en azul. Adaptada de Fernandez et al. 2015.

4-. Desarrollo embrionario de la glándula tiroides

El tiroides presenta dos tipos celulares predominantes: (1) Las células C, cuyo origen embrionario ha sido recientemente motivo de discusión entre las teorías que apuntan a que derivan de la cresta neural, de origen ectodérmico (Le Douarin et al. 2007) o del cuerpo ultimobranquial y por tanto del endodermo (Kameda et al. 2007; Johansson et al. 2015; Kameda 2016), y (2) las células epiteliales que forman los folículos (células foliculares), que constituyen la población mayoritaria y que derivan del endodermo.

4.1-. Especificación tiroidea

En esta tesis doctoral nos centraremos en las células foliculares de tiroides. En E8.5 en el caso del ratón, un grupo de células del endodermo faríngeo anterior, entre el primer y segundo arco branquial, comienzan a expresar de forma simultánea los factores de transcripción que aportarán identidad tiroidea a los precursores de las células foliculares: Nkx2-1, Pax8, FoxE1 y Hhex (Fernandez et al. 2015) en un proceso conocido como especificación. La expresión conjunta de estos cuatro factores de transcripción es exclusiva de las células foliculares (Fig-.10).

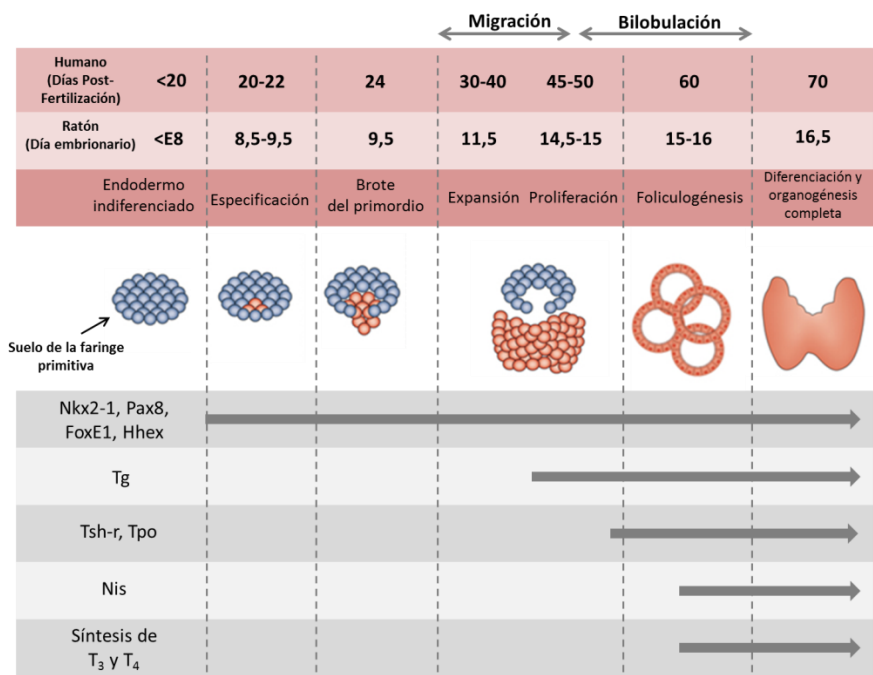


Figura 10. Expresión de los factores de transcripción tiroideos y marcadores tiroideos en las diferentes etapas del desarrollo embrionario de tiroides. La expresión conjunta de Nkx2-1, Pax8, Foxe1 y Hhex determina la especificación de un grupo de células del endodermo faríngeo entre E8.5-9.5 en el ratón. El primordio tiroideo se forma a E9.5. Desde E11.5, los precursores tiroideos comienzan a migrar hasta su posición final en la tráquea. Durante el proceso de migración, los precursores tiroideos proliferan y se expanden lateralmente para formar la estructura bilobulada típica del tiroides. Este proceso finaliza en torno a E15. En este momento, se observa expresión de Tg en el tiroides mientras que la expresión de Tpo y del Tshr no ocurre hasta E15.5 aproximadamente, cuando empieza la foliculogénesis. A E16.5, el tiroides está completamente formado y se observa expresión de Nis y síntesis de hormonas tiroideas. Adaptada de Macchia, P.E. 2000 y modificada de Fernández et al. 2015.

Las vías de señalización que están implicadas en las fases iniciales del desarrollo tiroideo, incluyendo las etapas previas a la especificación de los precursores tiroideos, son aun relativamente poco conocidas y motivo de controversia. La TSH, el principal regulador de la función tiroidea, parece no estar jugando un papel crucial en estas primeras etapas del desarrollo tiroideo, ya que el Tsh-r no comienza a expresarse hasta E15 en ratones. Además, en ratones KO para este receptor se ha observado que en el momento del nacimiento el tiroides no presenta alteraciones en su morfología, a pesar de presentar un tiroides hipoplásico en la etapa adulta. Esto indica que la TSH puede estar jugando un papel en el mantenimiento de la estructura folicular tiroidea en dicha etapa más que en la iniciación de la foliculogénesis (Postiglione et al. 2002). Se ha descrito que la señalización por TSH no es esencial para el comienzo de la expresión de Tg ya que en ratones modificados genéticamente en los que se ha inducido la expresión de una forma activada del TSH-R en etapas tempranas del desarrollo no se ha observado expresión prematura de genes controlados por TSH como Tg, NIS o TPO (Marians et al. 2002).

Estas evidencias sugieren que deben existir otras vías de señalización independientes de TSH que estarían participando y controlando los procesos implicados en la especificación tiroidea. En este

sentido se ha propuesto que el mesodermo cardiogénico que rodea al primordio tiroideo podría ser el responsable de la secreción de las señales y factores de crecimiento responsables de la especificación tiroidea (Fagman and Nilsson 2011). Este tipo de señalización, originada en el mesodermo cardiogénico, se ha descrito también para otros órganos derivados del endodermo, como el páncreas y el hígado (Wandzioch and Zaret 2009). Además, defectos en el desarrollo cardiaco están frecuentemente asociados al hipotiroidismo congénito, lo cual refuerza la hipótesis de la implicación del mesodermo cardiogénico y las señales secretadas por este tejido en el desarrollo del tiroides (Roberts et al. 1997). Entre estas señales secretadas por el mesodermo cardiogénico se ha propuesto un posible papel para Fgf y su receptor Fgfr, concretamente Fgfr2. Se ha detectado su expresión en células foliculares de tiroides y se ha descrito que la expresión de Nkx2-1 está regulada por Fgf8 en el hipotálamo y en los pulmones, por lo que podría estar implicado también en la expresión de Nkx2-1 en los precursores tiroideos. En el caso del pez cebra, la señalización por Fgf es fundamental para la correcta especificación tiroidea en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Wendl et al. 2007). Además, en ratones en los que se ha inactivado la función de Fgfr se ha observado hipoplasia de tiroides (Ohuchi et al. 2000).

Otras vías de señalización, como la vía de Shh, han sido estudiadas para dilucidar su posible papel en la especificación tiroidea y en las fases tempranas del desarrollo embrionario de tiroides. Se ha descrito la expresión de componentes de esta vía en los precursores tiroideos o en los tejidos adyacentes. Además, en ratones KO para Shh se ha observado hemiagenesia o ectopia de tiroides, lo que sugiere que esta vía está implicada en el desarrollo embrionario de tiroides y serán necesarios estudios en el futuro para aclarar su papel (Fagman et al. 2004).

4.2.- Migración y foliculogénesis

Entre E10.5 y E11.5, las células que forman el primordio tiroideo se expanden ventralmente y se disocian del suelo faríngeo. En este momento comienza un proceso de migración hacia la posición final de la glándula tiroides en la región anterior del cuello (Fig.-10). A E14.5, y tras haber alcanzado su posición definitiva, se forman los dos lóbulos que componen el tiroides en un proceso conocido como bilobulación cuyo mecanismo es aún desconocido. A partir de este momento se observa expresión de Tg en el tiroides embrionario (Postiglione et al. 2002).

A continuación las células precursoras comienzan a organizarse en folículos, la unidad funcional del tiroides. La foliculogénesis es un proceso fundamental en el desarrollo y en la evolución de la glándula tiroides. Comienza a E15.5 en el caso de ratones, finalizando a E18.5 (Villacorte et al. 2016). Los procesos que participan en el desarrollo de los folículos tiroideos son diversos y complejos. Entre ellos están la diferenciación y proliferación celular, el establecimiento de la polaridad de las células foliculares y la formación del lumen. En este sentido se ha descrito que la

INTRODUCCIÓN

membrana de las células foliculares de tiroides presenta una polaridad claramente establecida, la cual es fundamental para establecer la foliculogénesis y por tanto la síntesis eficiente de las hormonas tiroideas. La membrana basolateral se encuentra en contacto con el torrente sanguíneo y en ella se encuentran proteínas como el receptor de TSH, NIS o el transportador de hormonas tiroideas MCT8. En la membrana apical, en contacto con el coloide, se localizan el transportador pendrina, TPO o las oxidasas duales Duox1/2 (Fig.-2). Recientes estudios han demostrado el papel fundamental del factor de transcripción tiroideo Pax8 en el establecimiento de la polaridad apical-basal de la célula folicular tiroidea mediante el control de la expresión de Cadherina-16, ya que en ausencia de estas proteínas no se establece la polaridad de la célula folicular tiroidea, y por consiguiente la formación del lumen y del folículo tiroideo se ve interrumpida (Koumarianou et al. 2017). Con la foliculogénesis comienzan a expresarse la TPO y el TSH-R.

Este proceso de diferenciación de las células foliculares culmina a E16.5 con la expresión del simportador NIS y la síntesis de las hormonas tiroideas, por lo que los tirocitos son totalmente funcionales a partir de este momento (Fagman and Nilsson 2011).

4.3-. Nuevos modelos para el estudio del desarrollo embrionario

El papel de los cuatro factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8, FoxE1 y Hhex en los procesos de especificación, migración y diferenciación tiroidea ha sido estudiado en profundidad. Sin embargo, otros factores de transcripción que puedan estar participando en la regulación de la expresión de estos genes, así como las vías de señalización que pudieran estar implicadas en la especificación tiroidea, no se conocen bien y deberán ser estudiadas en el futuro. En este sentido, se han usado cultivos primarios de explantes de tiroides embrionarios de ratón para el estudio de las señales y procesos implicados en el desarrollo tiroideo (Delmarcelle et al. 2014). Sin embargo, este modelo conlleva dificultades técnicas considerables, así como la posibilidad de contaminación del cultivo con tipos celulares provenientes de otros tejidos adyacentes. Recientemente han surgido nuevos modelos de gran utilidad para el estudio de los procesos de desarrollo y diferenciación de diferentes órganos y tejidos basados en el establecimiento de células madre pluripotentes, es decir, con capacidad de dar lugar a cualquier tejido presente en el organismo adulto. Podemos diferenciar dos tipos de células madre:

- Células madre embrionarias (ESCs en sus siglas en inglés): Proviene de la masa celular interna de embriones en fases muy tempranas del desarrollo como el blastocisto (Evans and Kaufman 1981; Thomson et al. 1998).

- Células pluripotentes inducidas (iPSCs en sus siglas en inglés): Generadas a partir de fibroblastos adultos en los cuales se induce la expresión de cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc

y Klf4. La expresión de estos factores revierte el estado diferenciado de los fibroblastos hasta un estado de pluripotencialidad equiparable al de las ESCs (Takahashi and Yamanaka 2006).

La aparición de estos modelos celulares ha supuesto un gran avance en el estudio del desarrollo embrionario de diferentes órganos, así como en las tecnologías relacionadas con la organogénesis *in vitro* (Lancaster and Knoblich 2014). En el caso del tiroides tanto ESCs como iPSCs están siendo usadas en la actualidad para estudiar las señales y mecanismos moleculares implicados en la formación de esta glándula durante el desarrollo embrionario (Longmire et al. 2012; Ma et al. 2015). Usando estos modelos se ha descrito que la expresión de Nkx2-1 y Pax8 es necesaria y suficiente para la foliculogénesis y para la correcta diferenciación de las células foliculares tiroideas (Antonica et al. 2012; Dame et al. 2017). Así mismo, mediante un protocolo de diferenciación de ESCs murinas, recientemente se ha descrito que los factores de crecimiento BMP y FGF2 son suficientes para la expresión de Nkx2-1 y Pax8 y por consiguiente para la especificación de los precursores tiroideos a partir de células de endodermo derivadas de ESCs (Kurmann et al. 2015).

5-. Factores de transcripción de la familia Sox

La familia de proteínas Sox (Sry-related HMG Box) comprende un grupo de aproximadamente 20 factores de transcripción que juegan un papel fundamental en el desarrollo de numerosos órganos, pero con funciones normalmente muy divergentes (Uwanogho et al. 1995; Collignon et al. 1996; Kamachi and Kondoh 2013). Los treinta factores de transcripción Sox descritos hasta la fecha se dividen en nueve grupos según su función y su estructura (Yin 2016). Presentan como característica común un dominio de unión a DNA altamente conservado High Mobility Group (HMG) (Fig-. 11), que fue inicialmente descrito en el factor de transcripción Sry (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990).

5.1-. Sex-determining region Y (SRY)-box 9 protein (Sox9)

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el factor de transcripción Sox9, proteína de 509 aminoácidos perteneciente a la subfamilia SoxE e implicado en la determinación sexual masculina y en los procesos de osteogénesis (Wagner et al. 1994). El dominio HMG, común a todos los factores Sox, contiene en su secuencia señales de localización y exportación nuclear (Smith and Koopman 2004; Sim et al. 2008). Además, Sox9 presenta dominios de dimerización y transactivación en su secuencia aminoacídica (Wegner 1999)(Fig-.11). Sox9 presenta funciones muy diversas dependiendo del tejido, momento del desarrollo o enfermedad donde se estudie su expresión (Jo et al. 2014; Symon and Harley 2017). Es de gran interés para el presente trabajo el papel que se ha descrito para Sox9 en cuanto a su implicación en el desarrollo y diferenciación de

INTRODUCCIÓN

órganos de origen endodérmico (Shih et al. 2015; Yin 2016). En el caso del páncreas, la inhibición de la expresión de Sox9 da lugar a una severa hipoplasia de este órgano, evidenciando el papel fundamental de Sox9 en el desarrollo pancreático así como en el mantenimiento de su estado diferenciado (Seymour et al. 2012; Shih et al. 2015). En el hígado, Sox9 se expresa en los colangiocitos de los conductos biliares, controlando el proceso de maduración de estas estructuras durante el desarrollo embrionario del hígado (Antoniou et al. 2009; Kawaguchi 2013). Además, Sox9 puede tener un papel como marcador de células madre adultas específicas de tejido, que son aquellos progenitores celulares con capacidad de regenerar un tejido, como se ha descrito en el caso de los progenitores pancreáticos (Seymour et al. 2007). Además Sox9 se expresa en las células madre adultas de la pituitaria, manteniéndose su expresión en tumores de esta glándula como los craneofaringiomas (Garcia-Lavandeira et al. 2012).

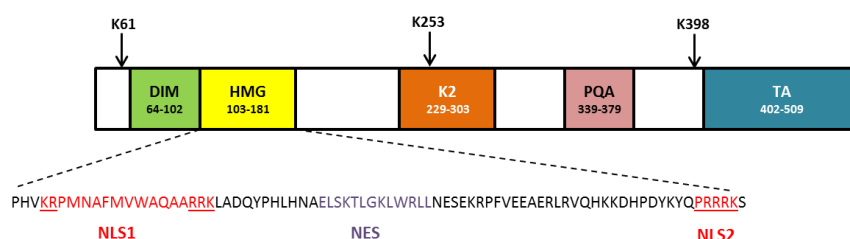


Figura 11-. Representación esquemática de la estructura de la proteína de Sox9. El dominio de dimerización (DIM) precede al dominio de unión a DNA (HMG) y a dos dominios de transactivación localizados en la posición central (K2) y C'-terminal (TA). Entre ellos se localiza el dominio rico en Prolina-Glutamina-Alanina (PQA), de función desconocida. Se muestra la secuencia conservada del dominio HMG. En ella se encuentran dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), con los residuos básicos subrayados, y la secuencia de exportación nuclear (NES). Las flechas indican los residuos de Lisina susceptibles de fosforilación.

Recientemente se ha descrito un papel importante para Sox9 en el control transcripcional de genes involucrados en el desarrollo embrionario de las válvulas cardíacas (Garside et al. 2015). En base a su papel en la diferenciación celular de varios órganos, se han realizado diversos estudios sobre el papel de Sox9 en la carcinogénesis de diversos tejidos, ya que uno de los procesos fundamentales en el desarrollo tumoral es la dediferenciación celular. Sox9 está implicado en la formación y en el crecimiento tumoral en diversos órganos como esófago, páncreas o próstata (Song et al. 2013; Jeannot et al. 2015; Ma et al. 2016). En estos órganos el papel de Sox9 en el desarrollo tumoral es ambiguo, ya que se observan patrones de expresión contradictorios dependiendo del tumor. En el caso de los carcinomas de tiroides, los más comunes dentro de los carcinomas de órganos endocrinos, Sox9 se expresa en mayor medida en los carcinomas papilares que en los anaplásicos, siendo estos últimos muchos más agresivos y de peor pronóstico por su mayor grado de dediferenciación. Así mismo, carcinomas anaplásicos de tiroides con baja expresión de Sox9 presentan peor pronóstico (Yun et al. 2014). En base a estas evidencias, es interesante estudiar el papel de Sox9 en el desarrollo y diferenciación de la célula folicular tiroidea.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo se dividen en dos apartados fundamentales divididos a su vez en diferentes subobjetivos:

1) Determinar la regulación de la expresión y la función del factor de transcripción FoxE1 en la célula folicular tiroidea

- a) Análisis *in silico* de la secuencia del promotor de FoxE1 e identificación de sitios consenso para diferentes factores de transcripción expresados en la célula folicular tiroidea.
- b) Estudiar la implicación de la vía del cAMP/PKA en la regulación de la expresión de FoxE1 inducida por la TSH.
- c) Estudiar la regulación de la expresión de FoxE1 por los factores de transcripción CREB y CREM.
- d) Estudiar la implicación de la citoquina TGF β en la regulación de la expresión de FoxE1 así como su mecanismo de acción.
- e) Estudio de la regulación de la expresión de FoxE1 por los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1.
- f) Profundizar en el papel de FoxE1 en la función tiroidea estudiando su implicación en la expresión del marcador de diferenciación NIS.

2) Determinar la expresión, regulación y función del factor de transcripción Sox9 en la célula folicular tiroidea

- a) Estudiar la expresión de Sox9 en el tiroides durante el desarrollo embrionario.
- b) Estudiar la expresión de Sox9 en la célula folicular diferenciada del tiroides adulto.
- c) Estudiar el papel de señales moleculares implicadas en la fisiopatología tiroidea como TSH, IGF1 y TGF β en la regulación de la expresión de Sox9, así como las vías de señalización implicadas en dicha regulación.
- d) Analizar el papel de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 en la regulación de la expresión de Sox9.
- e) Estudiar el papel de Sox9 en la regulación de la expresión de genes de diferenciación tiroideos.

MATERIALES Y MÉTODOS



1-. Materiales

1.1-. Anticuerpos

PRIMARIOS	Casa	Referencia	Dilución WB	Dilución IF/IHQ
β -Actina	Santa Cruz	1616R	1/1000	
pCREBSer133	Calbiochem	238466	1/1000	
CREB	Millipore	06-863	1/1000	
rNIS	Dra. N. Carrasco	a-r139p	1/5000	
Pax8	Biopat	PA0300	1/1000	1/100
α -Tubulina	Santa Cruz	5286	1/1000	
FoxE1	Biopat	PA0200	1/1000	
Nkx2-1	Biopat	PA0100	1/1000	1/100
Sox9	Millipore	AB-5535	1/1000	1/500
SECUNDARIOS				
Goat anti rabbit IgG-HPR	Santa Cruz	2004	1/2000	
Goat anti mouse IgG-HPR	Santa Cruz	2005	1/2000	
Anti rabbit-Alexa488	Molecular probes	A11034		1/500
Anti rabbit-Alexa546	Molecular probes	A11035		1/500
Anti mouse-Alexa488	Molecular probes	A11029		1/500
Anti mouse-Alexa546	Molecular probes	A11030		1/500

Tabla 1. Listado de anticuerpos usados en Western Blot, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

1.2-. Plásmidos

1.2.1-. Plásmidos reporteros

pRL-CMV: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa renilla, fusionado al promotor de expresión constitutiva del citomegalovirus (CMV), (Promega).

rNUE2.8-NIS: Vector construido en nuestro laboratorio que contiene el gen testigo de la luciferasa (pBSLuc2), fusionado a un fragmento de 2854 pb del promotor de NIS de rata, conteniendo el NUE (NIS upstream enhancer) y el promotor de dicho gen (Garcia and Santisteban 2002).

hTGenh/prom-Luc: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic), fusionado a un fragmento de 2000pb del promotor humano de TG (Pohlenz et al. 2002).

rPax8prom-Luc: Secuencia de DNA correspondiente a un fragmento de 2700 pares de bases del promotor de Pax8 de rata clonado en nuestro laboratorio fusionado al gen testigo de la luciferasa (pGL3basic) (Sastre-Perona and Santisteban 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

rNkx2-1prom-Luc: Secuencia de DNA correspondiente a 2800 pares de bases del promotor de Nkx2-1 de rata clonado en el vector pGL3basic conteniendo el gen testigo de la luciferasa (Oguchi and Kimura 1998).

mFoxE1prom3.1-Luc: Secuencia de DNA correspondiente a 3180 pares de bases del promotor y región codificante de FoxE1 de ratón clonado en nuestro laboratorio fusionado al gen testigo de la luciferasa (pGL3 basic).

mFoxE1prom2.3-Luc: Secuencia de DNA correspondiente a 2300 pares de bases del promotor y región codificante de FoxE1 de ratón clonado en nuestro laboratorio fusionado al gen testigo de la luciferasa (pGL3 basic)

mFoxE1prom0.5-Luc: Secuencia de DNA correspondiente a 1600 pares de bases del promotor y región codificante de FoxE1 de ratón clonado en nuestro laboratorio fusionado al gen testigo de la luciferasa (pGL3 basic).

hSox9prom-luc: Vector con la secuencia de DNA correspondiente a 1700 pares de bases del promotor humano de Sox9 fusionado al gen testigo de la luciferasa (pGL3basic) (Piera-Velazquez et al. 2007)

1.2.2-. Vectores de expresión

hPax8: cDNA del factor de transcripción Pax8 humano, clonado en el vector de expresión pcDNA3 (Vilain et al. 2001).

rNkx2-1: cDNA del factor de transcripción Nkx2-1 de rata, clonado en el vector pBluescriptII(KS-) (Guazzi et al. 1990).

CREB: cDNA del factor de transcripción CREB de humano clonado en el vector pGal4 (Mendez-Pertuz et al. 2003).

CMV-FoxE1: cDNA del factor de transcripción FoxE1 de rata clonado en el vector pCMV5 (Zannini et al. 1997).

RSV-CTF/NF1-C: Vector de expresión conteniendo el cDNA del factor de transcripción NF1 (Neb1 and Cato 1995).

hSox9: cDNA del factor de transcripción Sox9 humano clonado en el vector de expresión pcDNA3 (Lefebvre et al. 1997).

CREM: cDNA del factor de transcripción CREM de humano clonado en el vector pcDNA 3.1 (Sanchez-Elsner et al. 2001)

CMV5-Smad3: cDNA del factor de transcripción Smad3 humano bajo el promotor CMV5 (Costamagna et al. 2004).

CMV5-Smad4: cDNA del factor de transcripción Smad4 humano bajo el promotor CMV5 (Costamagna et al. 2004).

1.3-. Oligonucleótidos

Gen	Olinucleótido directo	Oligonucleótido reverso	Tamaño del amplicón	Especie
FoxE1	5'-TCATCACCGAGCGCTTCCCGTT-3'	5'-GCGGCTGCATCGTGCATGTA-3'	253 pb	Rata/Ratón
Pax8	5'-CAGCCTGCTGAGTTCTCCAT-3'	5'-CTGTCTCAGGCCAAGTCCTC-3'	143 pb	Ratón
	5'-GGACAGTTGTCGACTGAGCA-3'	5'-GAATGAGGATCTGCCACCAC-3'	300 pb	Rata
CREB	5'-CTGCCTCTGGTGATGTACAA-3'	5'-CAAGCACTGCCACTCTGTTC-3'	225 pb	Rata/Ratón
Sox9	5'-TACGACTGGACCCTGGTG-3'	5'-AGATGTGAGTCTGTTCCGGTG-3'	346 pb	Rata/Ratón
NIS	5'-AGCTGCCAACACTTCCAGAG-3'	5'-GATGAGAGCACCACAAAGCA-3'	142 pb	Ratón
	5'-AACGATTCGGTCTCCTG-3'	5'-GATGGCGTAAAGGTATCAGC-3'	111 pb	Rata
Nkx2-1	5'-ACCTTACCAGGACACCATGC-3'	5'-GGGCCATGTTCTTGCTCAC-3'	170 pb	Rata/Ratón
Tg	5'-GTCCAATGCCAAAATGATGGTC-3'	5'-GAGAGCATCGGTGCTGTTAAT-3'	165 pb	Ratón
	5'-ACGATGGGCTTATCAACAGG-3'	5'-ATATGGCAGCAGCAAGGAT-3'	147 pb	Rata
TSH-R	5'-CCAGACTCTGAAGCTCATCG-3'	5'-GTTCCGGATTCTATGTGAGTC-3'	169 pb	Rata/Ratón
TPO	5'-TGTGCAACAACAGAGATCACC-3'	5'-AGTTTGAGGGAAGCTGTATGG-3'	363 pb	Rata/Ratón
Actina	5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTT-3'	5'-CTCGTCATACTCTGCTTGCT-3'	314 pb	Rata
TBP	5'-TGTACCGCAGCTTCAAAATATTGTAT-3'	5'-AAATCAACGCAGTTGTCCGTG-3'	158 pb	Ratón
GUS	5'-CATGACGAACCACTCACCAC-3'	5'-ACGGTCTGCTCCCATACAC-3'	173 pb	Rata

Tabla 2. Listado de los oligonucleótidos usados para la amplificación de genes por qPCR.

PROMOTOR DE FOXE1	
Factor de Transcripción	Secuencia
CREB (Sitio 1)	5'-GCCCCACCCACTCTGACGTTGTGGAG-3'
	3'-CGGGTGGGGTGAGACTGCAACACCTC-5'
CREB (Sitio 2)	5'-AAGGTACTGGCCTCACGGTGAGAA-3'
	3'-TTCCATGACCGGAGTGCCACTCTT-5'
FoxE1	5'-GCGCATTCTAAACAGACGCAGGC-3'
	3'-CGCGTAAGATTTTGTCTGCGTCCG-5'
Nkx2-1	5'-TCTGCTGGACTGGGAGAATGACTT-3'
	3'-AGACGACCTGACCCTTTACTGAA-5'
Pax8 (Sitio 1)	5'-GACCCGCAGGAAGTCCCAAACAGTTGC-3'
	3'-CTGGGCGTCCTTGAGGGTTTGTAACG-5'
Pax8 (Sitio 2)	5'-GACAAGAAAATGCAGTGAGCCCTC-3'
	3'-CTGTTCTTTTACGTCAGTCTGGGAG-5'
Sox9 (Sitio 1)	5'-GTTGGAATTTTCCATGACCT-3'
	3'-CAACCTTAAAGGTACTGGA-5'
Sox9 (Sitio 2)	5'-TCATGACCTTTGTATTAATC-3'
	3'-AGTACTGGAAACATAATTAG-5'
Smad	5'-TCAGTCTCCGGCTTGGCGCGCAGA-3'
	3'-AGTCAGAGGCCAACCGCGCGTCT-5'

Tabla 3. Listado de oligonucleótidos usados para los ensayos de EMSA de los diferentes sitios de unión para factores de transcripción detectados en el promotor de FoxE1 de rata.

PROMOTOR DE SOX9	
Factor de transcripción	Secuencia
CREB	5'-CCTCGAGTCTCGTCACCCA-3'
	3'-GGAGCTCAGAGCAGTGGGT-5'
FoxE1	5'-AGTTTGAATAAACACGGATCCGA-3'
	3'-TCAAACTTATTTGTGCCTAGGCCT-5'
Pax8	5'-TTTCGGTCCAGGAACCTTTCTTTG-3'
	3'-AAAGCCAGGTCCTTAAAGAAAC-5'
Sox9	5'-ATGAATTTGTTTATCTTTTTTTT-3'
	3'-TACTTAAACAAATGAAAAAAA-5'
Smad	5'-CTCGGAAGTGTCTGGAACTTCAG-3'
	3'-GAGCCTTGACAGACCTTTGAAGAC-5'

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para los ensayos de EMSA de los diferentes sitios de unión para factores de transcripción detectados en el promotor de Sox9 de rata.

1.4-. Líneas celulares

-PCCI3: Línea celular epitelial tiroidea de rata, generada a partir de cultivos primarios de tiroides de ratas Fischer de 18 meses (Fusco et al. 1987). El crecimiento de esta línea es dependiente de TSH e insulina. Estas células expresan marcadores de diferenciación tiroideos (Tg, TPO, NIS y TSH-R) y los factores de transcripción específicos tiroideos (Nkx2-1, Pax8 y FoxE1). Debido a ello estas células son el modelo elegido para estudiar los procesos de diferenciación y proliferación tiroideos.

-Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs): Células pluripotentes generadas a partir de fibroblastos de ratón transfectados con los factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 (Takahashi and Yamanaka 2006). Las células fueron donadas por la Dra. Pilar Martín Duque de la Universidad Francisco de Vitoria (Madrid).

-Células madre embrionarias de ratón (mESCs): Se usaron células embrionarias obtenidas de la masa celular interna de blástulas de ratón transfectadas de forma estable con un vector con expresión dependiente de tetraciclina de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 o ambos factores de transcripción a la vez. Estas líneas celulares se generaron como se describió anteriormente (Ahfeldt et al. 2012; Antonica et al. 2012).

-Hela: Línea celular humana derivada de cáncer de cérvix.

1.5-. Modelos animales

Los experimentos con animales se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Christophe Pierreux de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica) en las instalaciones y animalarios de su laboratorio.

Se usaron ratones con expresión de la proteína de fusión Sox9-GFP generados en el laboratorio del Dr. Pierreux. Se obtuvieron los tiroides de estos ratones tanto de adultos como de embriones a diferentes días de desarrollo embrionario. Los ratones utilizados se mantuvieron en un ambiente estéril, mediante rayos U.V., con viruta, agua y comida administrada ad libitum. Cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂.

2.- Métodos

2.1.- Análisis *in silico* de secuencias de DNA

Se analizaron las secuencias de los promotores de los genes de interés desde el punto de inicio de la traducción hasta aproximadamente unas 3000 pares de bases corriente arriba. Todas las secuencias génicas se obtuvieron de la base de datos Ensembl (www.ensembl.org). Para el análisis de las secuencias de los promotores de los genes de interés y para la búsqueda de secuencias diana de factores de transcripción se usaron las bases de datos Transfac (www.gene-regulation.com) y ECR Browser (www.ecrbrowser.dcode.org).

2.2.- Cultivos celulares

- Las células PCCl3 se cultivaron en medio COON's Ham's F12 modificado, suplementado con un 5% de suero donador bovino y con una mezcla de 6 hormonas que contiene: somatostatina 10mg/ml, transferrina 5µg/ml, hidrocortisona 10nM, glicil-L-histidil-L-lisina 10ng/ml, TSH 1nm e insulina 10µg/ml (Sigma). En esta tesis doctoral se hará referencia a este medio como medio 6H o medio completo. En aquellos experimentos cuyo objetivo fue estudiar el efecto de los diferentes estímulos sobre las células PCCl3, éstas se cultivaron en el medio anterior, pero en ausencia de TSH e insulina y a una concentración menor de suero (0,2%), durante 48 horas. A este medio se hará referencia como medio basal o 4H. En esta situación experimental las células PCCl3 están en una situación quiescente y no expresan los factores de diferenciación tiroideos. Tras 48 horas en este medio, las células se trataron con diferentes concentraciones de hormonas, factores de crecimientos, e inhibidores como se detalla en la Tabla 5 y en cada uno de los experimentos de la sección de resultados. En el caso del uso de inhibidores, las células se preincubaron con ellos una hora antes de los tratamientos, cuya duración dependió del tipo de experimento y que se indica en cada uno de los resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVO	Concentración	Casa Comercial
TSH	0,5mU/ml	Sigma
IGF1	100ng/μl	Preprotech
Forskolina	10mM	Sigma
TGFβ	Según experimento	Preprotech
H89	10mM	Sigma
Activina A	50 ng/ml	R&D Systems

Tabla 5. Reactivos y concentraciones utilizadas

- Las mESCs se cultivaron en placas con un monocapa de fibroblastos de ratón irradiados en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 15% testado para cultivos de células embrionarias, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato sódico 1mM, penicilina 50U/ml y estreptomycin 50 mg/ml (Invitrogen en todos los casos), 2-mercaptoetanol 0.1mM (Sigma) y factor inhibidor de leucemia (LIF) 1000U/ml (ESGRO). Las células mESCs se diferenciaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Antonica et al. 2012). De manera resumida, los cuerpos embrioides se generaron mediante el cultivo de las mESCs en gotas (1000 células/gota) durante 4 días. A continuación se recogieron y se pusieron en Matrigel (BD Biosciences) sobre cristales en placas de 12 pocillos. Los cuerpos embrioides se cultivaron en el medio de diferenciación descrito anteriormente (Bondue et al. 2008) suplementado, en los casos indicados, con Doxyciclina 1μg/ml (Sigma) para activar la expresión de los vectores dependientes de tetraciclina, y TSH recombinante humana 1mU/ml (Genzyme) o 8-Br-cAMP (Sigma).
- Las células Hela se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%.

2.3-. Determinación de RNA

2.3.1-. Extracción de RNA

Las células después de ser tratadas con los diferentes estímulos se lavaron con PBS (Tampón fosfato pH 7) a 4°C, y el RNA se extrajo utilizando Trizol (Sigma) según las indicaciones del proveedor. La cantidad de RNA y su pureza se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280nm mediante el uso de un espectrofotómetro de espectro total Nanodrop.

2.3.2-. RT-PCR

Para cada una de las muestra se usaron 2 μg de RNA que fueron retro-transcriptos a cDNA según el protocolo que se detalla a continuación: se añadieron 200ng de dNTPs, 200ng de “randon

primers” para un volumen final de 14 μ l de agua destilada. Se desnaturalizó 10 minutos a 65 °C, tras lo cual se mantuvieron 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 200U de retrotranscriptasa M-MLV (Promega), 40U de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, Invitrogen), y el tampón que adjunta el proveedor comercial de la retrotranscriptasa (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l y se realizaron los siguientes ciclos en el termociclador: 10 minutos 25°C, 15 minutos 37°C, 15 minutos 40°C, 30 minutos a 42°C finalizando con 5 minutos a 95°C. El cDNA obtenido se diluyó 5 veces en agua destilada y se utilizó 1 μ l por cada una de las reacciones de PCR o PCR cuantitativa.

2.3.3-. PCR cuantitativa

Para llevar a cabo las PCR cuantitativas se usó la mezcla de reacción de SYBR green: KAPA SYBR FAST 2x con Rox y el aparato de PCR Mx3000P QPCR system (Agilent). Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, utilizando 150ng de cDNA en cada punto. Se realizaron los siguientes ciclos: 5 minutos a 95°C, a continuación 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 58-62°C, 30 segundos 72°C y 10 minutos a 72°C. La especificidad de cada par de oligonucleótidos se determinó realizando la curva de disociación. El software de “Stratagene analysis” fue el usado para obtener la fluorescencia basal. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Giulietti et al. 2001). Se representan los niveles de expresión de cada producto de PCR con respecto a la β -actina o GUS, según el experimento.

2.4-. Detección de proteínas

2.4.1-. Extracción de proteínas totales

Las células después de ser tratadas con los diferentes estímulos se lavaron con PBS (Tampón fosfato pH 7) a 4°C y se lisaron en tampón RIPA (PBS, 1%NP-40 1%, 1% SDS, 0,5% deoxicolato sódico) junto con un coctel de inhibidores de proteasas. Seguidamente se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se usaron para cuantificar las proteínas totales. La concentración de proteína fue determinada por el método Bradford (Bradford 1976), realizando una curva standard de albúmina sérica bovina (BSA).

2.4.2-. Western-blot

Extractos de proteínas totales (30 μ g), se separaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se bloquearon las membranas 1 hora a temperatura ambiente con una solución de PBS-T (PBS con Tween-20 al 0,1%) con leche desnatada al 5%. Tras la incubación O/N a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo se

MATERIALES Y MÉTODOS

realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T, seguidos de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa. Tras dos lavados con PBS-T y uno con PBS, las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante radiografía utilizando el agente de detección de Wester-blot Luminol (Thermo Fisher).

2.4.3-. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de células y tejidos

2.4.3.1-. Visualización de GFP en tiroides de ratones embrionarios

Los embriones se obtuvieron a E16.5 y tras la disección los diferentes tejidos se pusieron en PBS1X a 4°C. Para la visualización de la señal GFP en el tiroides se aislaron los tiroides embrionarios y se equilibraron en glicerol al 40%. El tiroides fue visualizado usando un microscopio de fluorescencia Zeiss NeoLumar y fotografiado con una cámara Olympus DP70.

2.4.3.1. Inmunofluorescencia

Células sembradas sobre cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. En el caso de tejidos se realizaron a partir de cortes en parafina y fueron desparafinados, rehidratados y se desenmascararon los antígenos incubándolas en tampón citrato (0,01M pH 6). Después de tres lavados con PBS, se permeabilizaron con PBS/0,1% TritónX-100 15 minutos y se incubaron en solución de bloqueo (PBS, 1% BSA) 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se incubaron O/N a 4°C con el anticuerpo primario en solución de bloqueo y en cámara húmeda. Tras otros tres lavados con PBS se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488 o 546 diluido en solución de bloqueo durante una hora. Por último, las muestras se lavaron 2 veces con PBS y una con agua destilada y se colocaron sobre portas utilizando “antifade” como líquido de montaje (Prolong Gold Invitrogen) conteniendo 4-,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción nuclear. Las células y tejidos fueron visualizados al microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo 40X. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal Espectra Leica TCS SP5 y un objetivo de 63x.

2.4.3.2-. Inmunohistoquímica

Las inmunohistoquímicas se realizaron a partir de cortes en parafina, se utilizó en kit EnVision+ System-HRP (DAB) (Dako). Las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas y se desenmascararon los antígenos incubándolas en tampón citrato (0,01M pH 6). Se inhibió la actividad peroxidasa endógena incubando las muestras con peróxido de hidrógeno al 3% y a continuación se incubó el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo (PBS1x, BSA1%)

durante 1 hora. Tras lavar las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con HRP durante una hora y se reveló con una solución de Diaminobencidina siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente las muestras fueron contra-teñidas con Hematoxilina, deshidratadas y montadas con medio de montaje DPX. Las células fueron visualizadas utilizando un microscopio de campo claro (Nikon 90i).

2.5-. Inhibición de la expresión génica: RNA de interferencia

Las células PCCl3 se sembraron en placas Petri de 60mm (600.000 células/placa) y se transfectaron con 25 nM de RNA de interferencia de CREB, Sox9, FoxE1 o Pax8 (Rat CREB, Sox9, FoxE1 o Pax8 ON-TARGETplus SMARTpool) o con RNA de interferencia inocuo (ON-TARGETplus Non-targeting Pool) usando el agente de transfección DharmaFECT1 y siguiendo las indicaciones del proveedor (Dharmacon). Las células fueron tripsinizadas 24, 48 y 72 horas tras la transfección para la extracción de RNA y proteínas totales.

2.6-.Transfecciones transitorias

Se sembraron 350.000 (PCCl3) o 200.000 células (Hela) en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas se añadió el medio completo correspondiente a cada línea celular con HEPES 10mM a pH 7,35 y se realizó la transfección. Las células Hela y PCCl3 se transfectaron por coprecipitación con fosfato de calcio (Chen and Okayama 1988). El agente de transfección FuGENE (Promega) se usó en ciertos casos para la línea PCCl3 siguiendo las instrucciones del proveedor. En los análisis de actividad de los promotores las células fueron transfectadas con 1,5 µg del vector correspondiente. Con el objetivo de controlar la eficiencia de transfección se añadieron 250ng del vector de expresión de renilla bajo el control del promotor de CMV. Las co-transfecciones con otros vectores de expresión se indican en cada caso. La cantidad de DNA total que se añadió en cada uno de los experimentos de transfección se mantuvo constante complementando la cantidad restante con un vector de expresión vacío (pcDNA3.1). Después de 24 horas tras la transfección se cambió el medio a 4H en el caso de las células PCCl3 durante 48h. Tras este periodo de tiempo, las células PCCl3 transfectadas fueron tratadas 24h con los estímulos indicados en cada experimento. En el caso de las células Hela se cambió el medio de cultivo 24 horas tras la transfección y se mantuvieron otras 24 horas en medio de cultivo completo. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con PBS y se recogieron en buffer de lisis pasiva para el análisis de la actividad luciferasa y renilla en el luminómetro (Promega). La actividad del promotor se determinó como la relación entre la actividad luciferasa y la actividad renilla. La expresión de los vectores transfectados se determinó mediante Wester blot.

2.7-. Ensayos de unión proteína-DNA: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Los oligonucleótidos cuyas secuencias contenían los sitios de unión de los distintos factores de transcripción (Tablas 2 y 3) se marcaron con 25 μ Ci de Gamma-ATP usando la T4 polinucleótido quinasa (Promega). El oligonucleótido marcado se purificó usando columnas Quick Spin G-25 Sephadex (Roche). Las diferentes proteínas recombinantes se obtuvieron mediante el uso de un kit comercial de transcripción-traducción (TNT) *in vitro* (Promega). Para favorecer la unión de las proteínas a las secuencias de DNA se incubaron 7 μ g de los extractos proteicos junto con los oligonucleótidos marcados radiactivamente (30.000 cpm por muestra). Las reacciones de unión proteína-DNA se llevaron a cabo en un tampón que contenía 40 mM Hepes pH 7.9, 75 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 150ng/ μ l de poly(dI-dC) y Ficoll al 5% a temperatura ambiente 30 minutos. Para evaluar si la unión proteína-DNA era específica, se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido sin marcar o con otros oligonucleótidos no relacionados sin marcar, que fueron añadidos en exceso unas 50 veces con respecto al oligonucleótido marcado. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de proliacrilamida usando como tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) al 0.5X.

RESULTADOS



1-. Regulación de la expresión de FoxE1 y su implicación en la diferenciación de las células foliculares de tiroides.

1.1-. Análisis *in silico* del promotor de FoxE1

El papel fundamental del factor de transcripción FoxE1 en el desarrollo y la diferenciación de la célula folicular tiroidea ha sido estudiado en profundidad. Así mismo, es uno de los tres factores de transcripción, junto con Nkx2-1 y Pax8, que definen la identidad tiroidea de las células precursoras derivadas del endodermo durante las fases tempranas del desarrollo embrionario del tiroides (De Felice and Di Lauro 2004). Se ha descrito su implicación en el control de la transcripción de genes de diferenciación tiroidea como Tg o TPO (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993). Sin embargo, las señales moleculares y la existencia de otros factores de transcripción que pudieran estar implicados en la regulación de la expresión de FoxE1 en fases tempranas del desarrollo embrionario anteriores a la especificación así como en la célula folicular diferenciada, han sido poco estudiados hasta la fecha. Trabajos previos de nuestro laboratorio describieron el papel que la TSH e IGF1 tienen en la activación transcripcional de FoxE1 (Ortiz et al. 1997). Por ello, teniendo en cuenta que la vía del cAMP es la vía principal a través de la cual TSH media su función, en esta tesis doctoral nos propusimos estudiar la presencia de sitios de respuesta a cAMP en la región promotora de FoxE1, así como de sitios de unión para otros factores de transcripción implicados en la diferenciación tiroidea, como Nkx2-1, Pax8, Smad o el propio FoxE1.

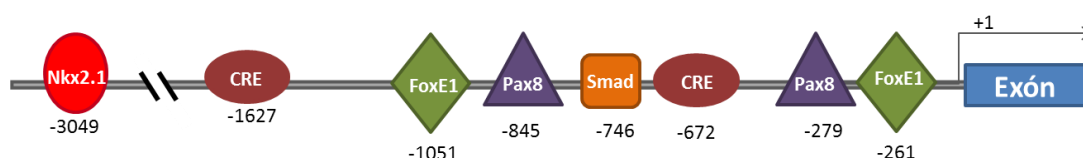


Figura 12. Representación esquemática de la región promotora del gen FoxE1 de rata con los sitios de unión de diferentes factores de transcripción identificados en su secuencia.

Se analizó la secuencia promotora de FoxE1 de rata correspondiente a las 3100 pares de bases en sentido 5' desde el inicio de la traducción. El estudio *in silico* de esta secuencia de DNA arrojó la presencia de elementos de unión para los tres factores de transcripción tiroideos. Se identificó un sitio de unión para Nkx2-1 (-3049), dos sitios de unión para FoxE1 en las posiciones -261 y -1051 y dos sitios de unión de Pax8 en las posiciones -279 y -845. Además se indentificó un elemento de unión de proteínas Smad (-672). Fue particularmente interesante, teniendo en cuenta el papel de TSH en la regulación de la expresión de FoxE1, la presencia en el promotor de FoxE1 de dos sitios

RESULTADOS

CRE en las posiciones -672 y -1627 (Fig.-12). Se compararon las secuencias de los promotores de FoxE1 de rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*), encontrándose una homología superior al 90%.

1.2-. TSH induce la expresión de FoxE1 a través de la vía de cAMP/CREB

Trabajos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el factor de transcripción FoxE1 actuaba como mediador de la respuesta inductora de TSH e IGF1 sobre los promotores de los genes de Tg y TPO (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993). La identificación de los sitios CRE en el promotor de FoxE1 ha sido de gran interés ya que se puede establecer la hipótesis de que la TSH a través de la vía del cAMP activaría el promotor de FoxE1 confirmando los resultados previos del aumento del mRNA de FoxE1 por la TSH (Ortiz et al. 1997). Por ello uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar si los aumentos descritos en los niveles de mRNA de FoxE1 se traducían en un aumento en los niveles de proteína de este factor de transcripción, así como demostrar que el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1 ocurría a nivel transcripcional regulando la actividad del promotor de FoxE1.

Para ello células PCCl3 se mantuvieron en medio 4H durante 48 horas, periodo tras el cual se estimularon con TSH 16 horas (Fig.- 13A) o 24 horas (Fig.- 13B). Para determinar la implicación de la vía del cAMP/PKA se trataron las células con análogo del cAMP Forskolina o con H89, un inhibidor específico de la PKA. El análisis de los niveles de mRNA de FoxE1 reflejó que la TSH así como la Forskolina inducen la expresión de FoxE1, lo que indica que la activación de la expresión de FoxE1 está mediada por cAMP (Fig.-13 A). Así mismo, el tratamiento con H89 inhibió el efecto inductor de la TSH y la Forskolina, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig.- 13B). Estos resultados en su conjunto confirman la implicación de la vía del cAMP/PKA en la activación de la expresión FoxE1 inducida por TSH.

Con el objetivo de evaluar si el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1 ocurría a nivel transcripcional a través de la activación de su promotor, se realizaron transfecciones transitorias en células PCCl3 con dos construcciones del promotor de FoxE1: pFoxE1-3.1, que contiene los dos sitios CRE identificados en el promotor de FoxE1 (-1627 y -672), y pFoxE1-0.5, que contiene únicamente el sitio CRE más cercano al sitio de inicio de la transcripción (-672) (Fig.-12). Las células transfectadas se mantuvieron en 4H y a continuación fueron tratadas con TSH. En aquellas células transfectadas con el vector pFoxE1-3.1 se observó que la TSH aumentaba hasta 5 veces la actividad del promotor, mientras que dicha activación fue manifiestamente inferior en el caso de las células transfectadas con pFoxE1-0.5 (Fig.-13 C). Estos resultados demuestran que TSH

induce la expresión de FoxE1 a través de la activación de su promotor y que, concretamente, el sitio CRE identificado en la posición -1627 de la secuencia del promotor de FoxE1 juega un papel fundamental y necesario para que la regulación por esta hormona tenga lugar.

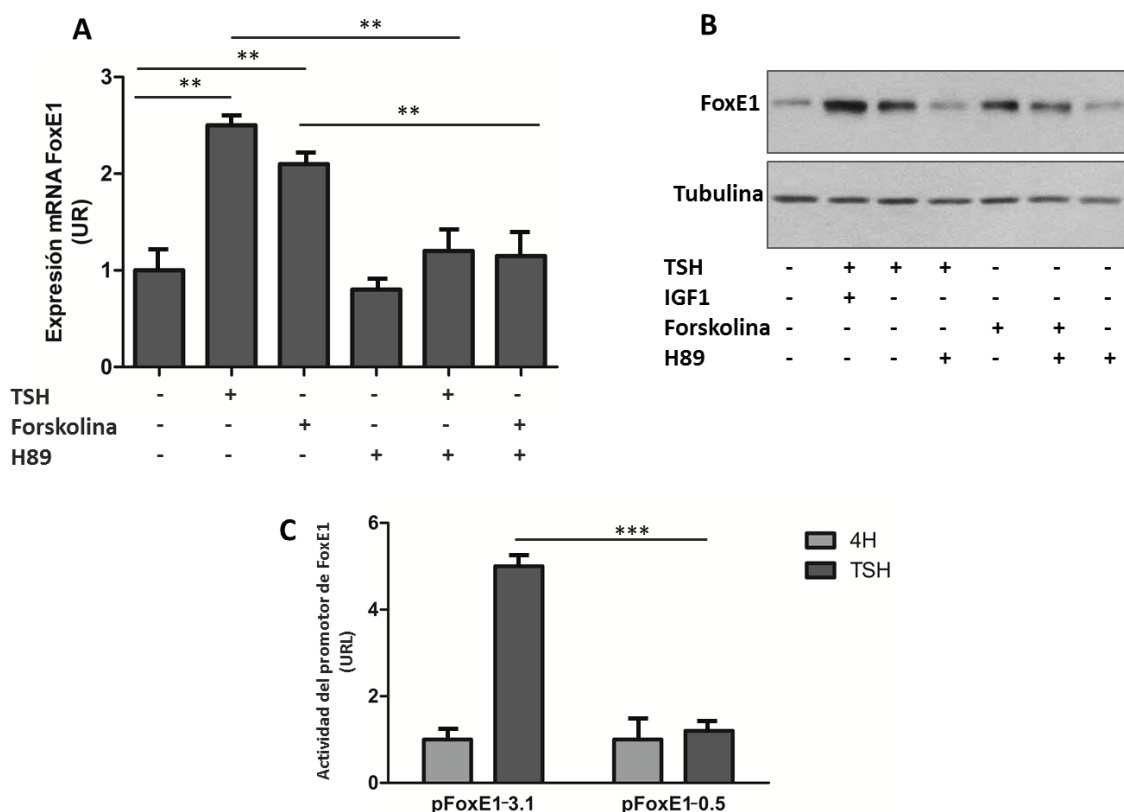


Figura 13. Efecto de la TSH en la expresión del factor de transcripción FoxE1. Las células PCCl3 fueron cultivadas 48 horas en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en este medio o fueron tratadas con los diferentes estímulos indicados en cada caso 16 horas (A) o 24 horas (B). El inhibidor H89 se añadió al medio 1,5 h antes de los tratamientos con TSH y Forskolina. **Panel A:** Se aisló RNA total y se detectaron mediante qPCR los niveles del mRNA de FoxE1 relativos a la expresión de la β -actina. **Panel B:** Se obtuvieron extractos totales de proteína de células PCCl3 y se analizaron mediante Western-blot los niveles de FoxE1 en cada tratamiento. Se detectaron los niveles de α -tubulina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Células PCCl3 fueron transfectadas con 1,5 μ g de pFoxE1-3.1 o pFoxE1-0.5 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células fueron cultivadas 24h en medio 6H. A continuación se mantuvieron 48 horas en medio 4H y transcurrido este tiempo las células fueron tratadas con TSH 24 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad del promotor se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células mantenidas en medio 4H se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***).

RESULTADOS

Dado que el factor de transcripción CREB es el efector final de la vía del cAMP/PKA, y habiendo confirmado la implicación de esta vía en la regulación de la expresión de FoxE1 por TSH, el siguiente paso fue confirmar la unión de CREB a los sitios CRE identificados en el promotor de FoxE1, así como evaluar si esa posible unión era funcional y se traducía en un aumento de la actividad transcripcional del promotor de FoxE1 y por consiguiente en un aumento de su expresión. Se llevaron a cabo ensayos EMSA usando dos oligonucleótidos conteniendo cada uno ellos los sitios CRE detectados en el promotor de FoxE1. La incubación de estos oligonucleótidos con CREB recombinante dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética de estos oligonucleótidos, lo cual permite concluir que CREB se unen a esos sitios CRE, siendo esta unión más fuerte y evidente en el caso del sitio 2 (-1627) (Fig-.14 A). Posteriormente, con el propósito de evaluar el efecto de la unión de CREB a los sitios CRE del promotor de FoxE1 se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células Hela de las construcciones pFoxE1-3.1 y pFoxE1-0.5 junto con un vector de expresión de CREB. Se observó que la sobre expresión de CREB activó hasta 70 veces la actividad del promotor de FoxE1 en el caso del vector pFoxE1-3.1, mientras que esa activación fue mucho menor en células transfectadas con el vector pFoxE1-0.5 (Fig-.14 B). Estos datos confirman la funcionalidad de los sitios CRE detectados en el promotor de FoxE1 y el papel más relevante del sitio CRE situado en la posición -1627, en la mediación de la respuesta a TSH.

Para confirmar el papel de CREB en la activación de la expresión de FoxE1, se inhibió la expresión de CREB en células PCCl3 (Fig-. 14 C y D). En células con CREB silenciado los niveles de mRNA de FoxE1 se vieron drásticamente reducidos en comparación con las células que habían sido transfectadas con el vector siScrambl y que por tanto conservaban la expresión de CREB siendo esta reducción más evidente a las 16 horas de la transfección (Fig-.14 C). Los niveles proteicos de FoxE1 fueron evaluados a las 48 horas de la transfección, observándose una reducción clara de los niveles de expresión proteica de FoxE1 como consecuencia de la inhibición de la expresión de CREB (Fig-.14 D). Estos resultados demuestran que el factor de transcripción CREB es necesario para la expresión de FoxE1 en las células foliculares de tiroides y que podría estar implicado en la regulación de la expresión de FoxE1 por TSH a través de la vía del cAMP/PKA.

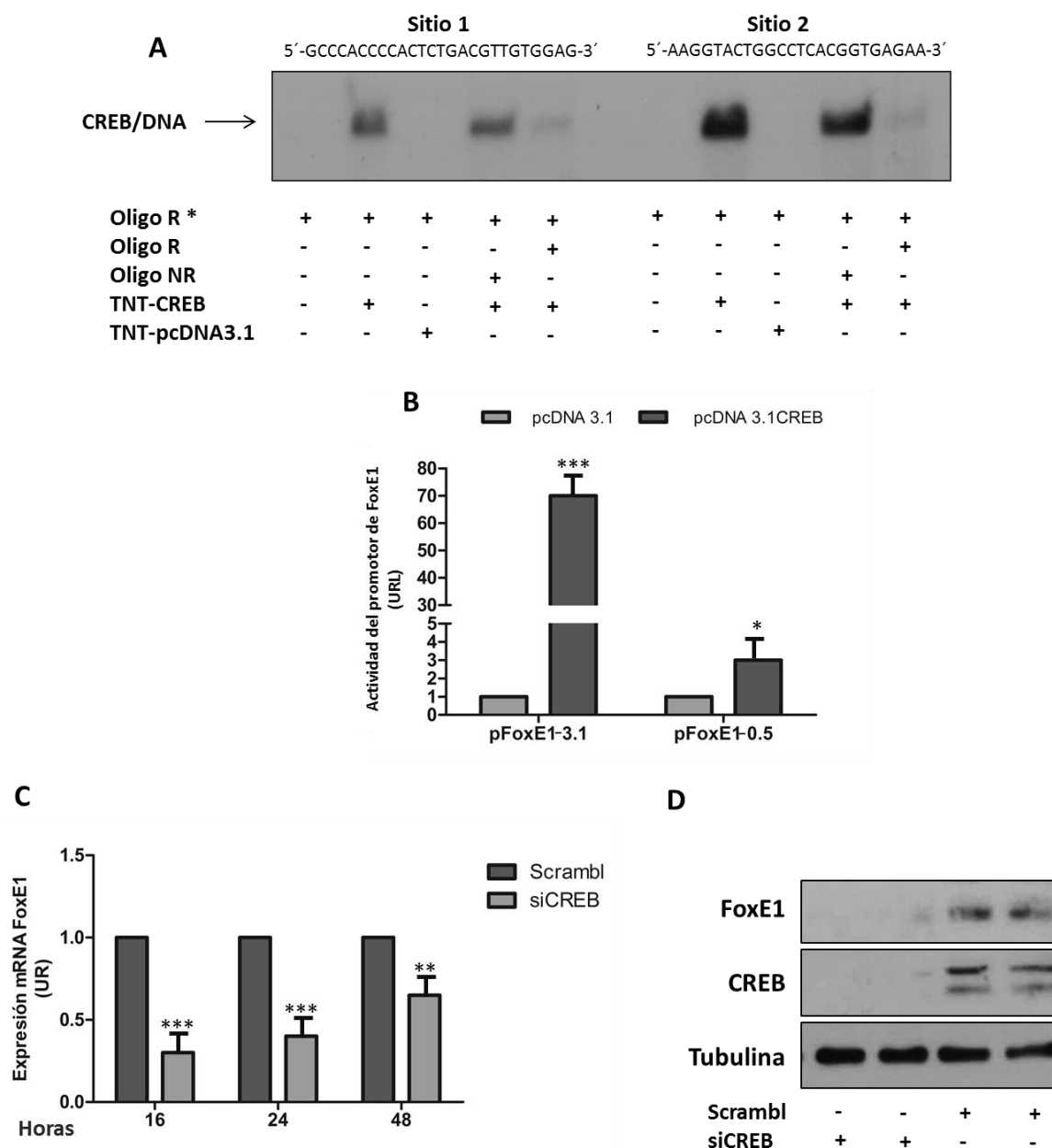


Figura 14. Función del factor de transcripción CREB en la expresión de FoxE1. **Panel A:** El EMSA se realizó con dos oligonucleótidos marcados radiactivamente con P^{32} conteniendo en sus secuencias los sitios de respuesta a cAMP identificados en el promotor de FoxE1. Los oligonucleótidos marcados (Oligo R*) fueron incubados en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de CREB recombinante (TNT-CREB). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligos NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel B:** Células Hela fueron transfectadas con 1,5 μ g de pFoxE1-3.1 o pFoxE1-0.5, 1,5 μ g de pcDNA3.1-CREB o pcDNA 3.1 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM completo 48 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células transfectadas con pcDNA 3.1 4H se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***). **Panel C y D:** La expresión de CREB fue inhibida en células PCCI3 mediante la transfección de un vector de expresión con un siRNA específico (siCREB). Células PCCI3 transfectadas con los vectores siCREB y siScramble se cultivaron en medio 6H y recolectadas a las 16, 24 y 48 horas para la detección de los niveles de mRNA de FoxE1 (**C**) o a las 48 horas para la detección de los niveles de proteína de FoxE1 (**D**). La expresión de CREB se analizó como control del funcionamiento del siRNA y la de α -tubulina como control de carga.

RESULTADOS

1.3-. El factor de transcripción CREM se une a los sitios CRE del promotor de FoxE1 y activa su expresión.

El factor de transcripción CREM tiene la capacidad de unirse a los sitios CRE presentes en los promotores de aquellos genes regulados por cAMP. En el caso de la célula folicular tiroidea, se ha descrito su unión al CRE existente en el NUE de NIS, que es la principal región reguladora del promotor de NIS. Esta unión da lugar a un aumento en la actividad del promotor de NIS y consecuentemente a un aumento en su expresión (Fenton et al. 2008). La importancia de los sitios CRE presentes en el promotor de FoxE1 en la regulación de su expresión ha sido descrita previamente en esta tesis (Fig-. 13 y 14). Por ello nos propusimos estudiar la posible implicación de CREM en la expresión de FoxE1 como otro de los factores de transcripción potencialmente implicados en la regulación transcripcional de la expresión de este gen. En primer lugar se llevó a cabo un ensayo de EMSA con un oligonucleótido que contenía la secuencia del CRE detectado en la posición -1627 del promotor de FoxE1. La incubación de este oligo con CREM recombinante dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética de este complejo. (Fig-. 15 A). Este resultado confirma que CREM se une al promotor de FoxE1, concretamente al sitio CRE situado en la posición -1627 que es el que juega un papel más relevante en la regulación de su expresión.

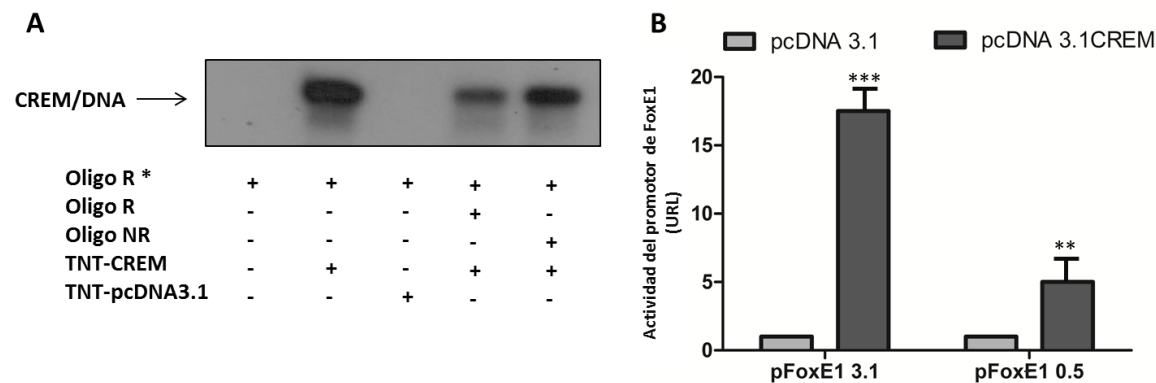


Figura 15. Función del factor de transcripción CREM en la regulación del promotor de FoxE1. **Panel A:** El ensayo de cambio de movilidad electroforética se realizó con el oligonucleótido marcado radiactivamente con P^{32} conteniendo en su secuencia el sitio de respuesta a cAMP identificado en el promotor de FoxE1. El oligo marcado (Oligo R*) fue incubados en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de CREM recombinante (TNT-CREM). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel B:** Células Hela fueron transfectadas con 1,5 μ g de pFoxE1-3.1 o pFoxE1-0.5, 1,5 μ g de pcDNA3.1-CREM o pcDNA 3.1 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM completo 48 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. Los cambios se consideraron significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***)

A continuación, para evaluar si la unión de CREM al promotor de FoxE1 era funcional, se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células Hela de las construcciones pFoxE1-3.1, que contiene el sitio CRE de la posición -1627, y pFoxE1-0.5 junto con un vector de expresión de CREM (Fig-. 15B). La sobre expresión de CREM en células transfectadas con el vector pFoxE1 3-1 se tradujo en un aumento de la actividad transcripcional de promotor de hasta 17 veces con respecto a las células sin expresión de CREM. Esta activación del promotor fue notablemente menor cuando se usó una construcción sin el sitio CRE -1627. Estos datos demuestran que CREM se une al promotor de FoxE1 induciendo su activación. Además, esta unión se da preferencialmente en el sitio CRE situado en la posición -1627 y confirma la importancia de este sitio CRE en comparación con el situado en la posición -672 a la hora de regular la activación del promotor de FoxE1 y por tanto su expresión.

1.4-. TGFβ inhibe el efecto inductor de TSH sobre la expresión de FoxE1

El TGFβ, así como sus receptores y las proteínas implicadas en su vía de señalización, se expresan en las células foliculares de tiroides. Esta citoquina ha sido descrita como uno de los factores de crecimiento implicados en la diferenciación, crecimiento y fisiología de la célula folicular tiroidea (Carneiro et al. 1998; Pekary and Hershman 1998; Nicolussi et al. 2003). Trabajos previos de nuestro laboratorio han descrito que el TGFβ inhibe la expresión de NIS inducida por TSH mediante un mecanismo basado en la reducción de la expresión de Pax8 y en la inhibición de la unión de este factor de transcripción a su secuencia consenso en el promotor de NIS (Costamagna et al. 2004). En base a estas evidencias, nos propusimos estudiar el papel del TGFβ en la regulación de la expresión de FoxE1.

Se llevaron a cabo experimentos con células PCCI3 mantenidas en medio 4H y posteriormente tratadas con TSH y concentraciones crecientes de TGFβ. Los resultados indicaron que TGFβ inhibe los niveles de FoxE1 de manera dosis-dependiente siendo de un 70% a 10ng/ml de TGFβ (Fig-.16 A). Se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizaron los niveles proteicos de FoxE1 (Fig-. 16 B).

Posteriormente nos propusimos estudiar si el efecto inhibitorio del TGFβ sobre la expresión de FoxE1 inducida por TSH ocurría también en células no diferenciadas. Para ello se usó como modelo una línea celular de mESCs con expresión inducible por Doxiclina de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8 siguiendo el protocolo de diferenciación a células foliculares anteriormente descrito (Antonica et al. 2012). Tras 21 días de diferenciación, las células

RESULTADOS

pluripotentes en las que se había inducido la expresión de Pax8 y Nkx2-1 con Doxiciclina y sendos tratamientos con TSH y 8-Br-cAMP, expresaban elevados niveles de mRNA de FoxE1, de más de 50 y 200 veces respectivamente en comparación con las mESCs sin diferenciar (Fig-. 16C). Posteriormente estas células se trataron con TGFβ, además de con TSH y 8-Br-cAMP, durante el proceso de diferenciación. Se observó que los niveles de expresión de mRNA de FoxE1 fueron significativamente menores en comparación con células que no fueron tratadas con TGFβ. Este efecto inhibitorio del TGFβ fue mucho más evidente en el caso de las células tratadas con 8-Br-cAMP, donde se había observado una mayor activación de la expresión de FoxE1 (Fig-. 16C). Estos resultados permiten afirmar que TGFβ inhibe el efecto positivo de TSH y de la vía del cAMP/PKA/CREB sobre la expresión de FoxE1, tanto en células foliculares de tiroides diferenciadas como en células embrionarias durante el proceso de diferenciación a células foliculares.

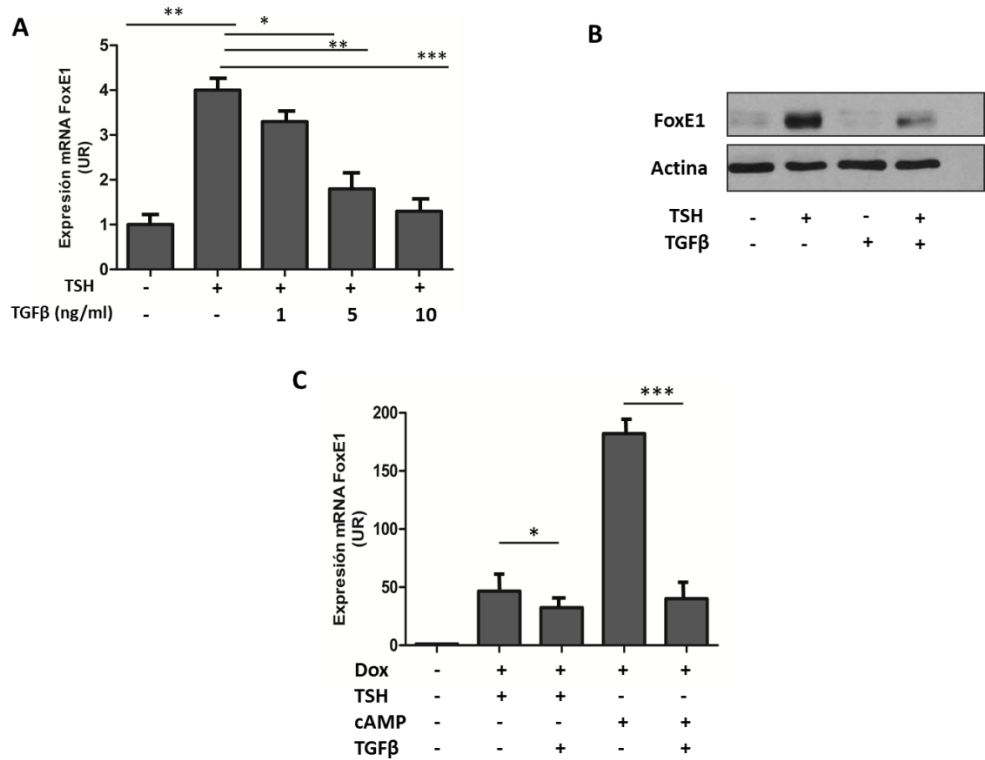


Figura 16. Efecto del TGFβ en la activación de la expresión de FoxE1 inducida por TSH. (A y B) Las células PCCl3 fueron cultivadas 48 horas en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en este medio o fueron tratadas con los diferentes estímulos indicados en cada caso 16 horas (A) o 24 horas (B). **Panel A:** Se aisló RNA total y se detectaron mediante qPCR los niveles del mRNA de FoxE1 relativos a la expresión de la β-actina. **Panel B:** Se obtuvieron extractos totales de proteína de células PCCl3 y se analizaron mediante Western-blot los niveles de FoxE1 en cada tratamiento. Se detectaron los niveles de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Las células mESCs con expresión inducible de Nkx2-1 y Pax8 se cultivaron en medio de mantenimiento previamente a la generación de los cuerpos embrioides. Tras 4 días, los cuerpos embrioides se recolectaron y se cultivaron en medio de diferenciación con o sin Doxiciclina durante 3 días. A continuación las células se mantuvieron en medio de diferenciación con TSH, 8'-Br-cAMP o TGFβ 14 días tras lo cual se recolectaron. El RNA fue extraído y retro-transcrito para la posterior detección mediante qPCR de los niveles del mRNA de FoxE1 relativos a la expresión de la β-actina. Los cambios fueron considerados significativos cuando p<0,05 (*), p=0,01 a 0,001(**), p<0,001 (***).

Dado que, como se ha descrito anteriormente, TGF β estaba inhibiendo el efecto inductor de TSH sobre la expresión de FoxE1, se quiso estudiar si este efecto estaba mediado por las proteínas Smad como efectores finales de la vía de señalización de TGF β . Así mismo se propuso estudiar si esta regulación de la expresión de FoxE1 por TGF β ocurría a nivel transcripcional mediante la regulación de la activación del promotor de FoxE1. Para ello se realizó un ensayo de EMSA con un oligonucleótido que contenía en su secuencia el elemento de unión de proteínas Smad detectado en el promotor de FoxE1 de rata en la posición -746 con respecto al inicio de la transcripción (Fig. 17A). La incubación de este oligonucleótido con Smad3 recombinante dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética de dicho oligonucleótido, lo cual nos permite afirmar que Smad3 se unía de forma específica a dicha secuencia del promotor de FoxE1. Confirmado este punto, se propuso estudiar el efecto de la unión de las Smad sobre la regulación de la actividad del promotor de FoxE1. Para ello se llevaron a cabo ensayos de transfección transitoria en células PCCl3 de la construcción pFoxE1-3.1. Las células transfectadas se mantuvieron en medio 4H y posteriormente fueron tratadas con TSH o con TSH y concentraciones crecientes de TGF β (Fig. 17B). En base a los resultados obtenidos, se puede observar que el efecto inhibitorio de TGF β sobre la inducción de la expresión de FoxE1 ocurre a nivel transcripcional, ya que el TGF β inhibe la activación del promotor de FoxE1 inducida por TSH. Habiendo observado que TGF β está implicado en la regulación del promotor de FoxE1 a través de las proteínas Smad, estudiamos si la unión de Smad3 al promotor de FoxE1 afectaba a la activación inducida por la unión de CREB. Para ello se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células Hela de la construcción pFoxE1-3.1 junto con vectores de expresión de Pax8, CREB y Smad3 (Fig. 17C). Se observó que la inducción de la actividad del promotor de FoxE1 producida por la sobre expresión de CREB y Pax8 se vio inhibida cuando se sobre-expresó Smad3 en ambos casos. La sobre-expresión conjunta de Pax8 y CREB dio lugar a una activación del promotor de FoxE1 de unas 30 veces. Esta activación se vio también inhibida cuando se sobre-expresó Smad3.

Todos estos resultados en su conjunto permiten concluir que TGF β inhibe la activación de la expresión de FoxE1 inducida por TSH a nivel transcripcional, así como que la activación de la vía de las Smad inhibe el efecto positivo de CREB y Pax8 sobre la activación del promotor de FoxE1. Además, podemos concluir que este efecto de TGF β sobre la expresión de FoxE1 ocurre tanto en células diferenciadas como en células pluripotentes en las que se indujo la expresión de Pax8 y Nkx2-1 para su diferenciación a células foliculares de tiroides.

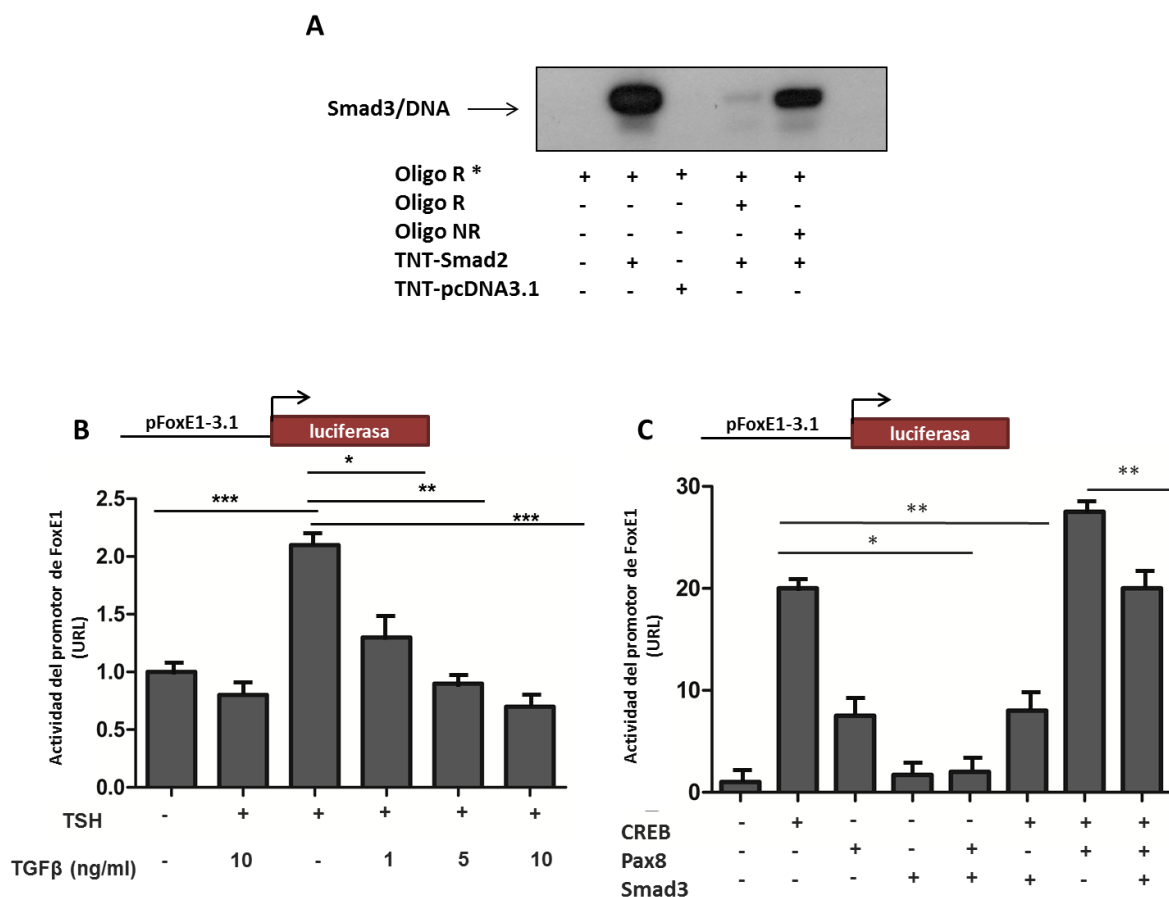


Figura 17. Papel de la vía de las Smads en la inhibición del efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1. Panel A: El ensayo de cambio de movilidad electroforética se realizó con el oligo marcado radiactivamente con P^{32} conteniendo en su secuencia el elemento de unión a proteínas Smad detectado en el promotor de FoxE1. El oligo marcado (Oligo R*) fue incubado en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de Smad3 recombinante (TNT-Smad3). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel B:** Células PCC13 fueron transfectadas con 1,5μg de pFoxE1-3.1 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células fueron cultivadas 24h en medio 6H. A continuación se mantuvieron 48 horas en medio 4H y transcurrido este tiempo las células fueron tratadas con TSH y/o TGFβ a las concentraciones indicadas 24 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. **Panel C:** Células HeLa fueron co-transfectadas con 1,5μg de pFoxE1-3.1 y 1,5μg de CMV5-Smad3, pcDNA3.1-CREB y/o pcDNA3.1-Pax8 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron 48 horas en medio DMEM completo y transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. **(B y C)** La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Los cambios fueron considerados significativos cuando $p<0,05$ (*), $p=0,01$ a $0,001$ (**), $p<0,001$ (***).

1.5-. Los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 se unen al promotor de FoxE1 y cooperan positivamente en la regulación de su expresión

Los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 se expresan de forma conjunta únicamente en el tiroides siendo esta expresión esencial para el correcto desarrollo embrionario de la glándula

tiroides así como para la diferenciación y función de la célula folicular tiroidea. Estos factores de transcripción regulan de forma conjunta la expresión de proteínas diferenciadoras de la célula folicular tiroidea como Tg, TPO o NIS. Además, estos tres factores de transcripción forman una red de control transcripcional en la que la expresión de cada uno de ellos está controlada por otro factor, y a su vez controlan la expresión de sus genes diana tanto en el desarrollo embrionario como en la célula folicular diferenciada (Damante et al. 2001). Es por ello que, y en base a los resultados obtenidos del análisis *in silico* del promotor de FoxE1 de rata en los que se identificaron diferentes sitios de unión para estos factores de transcripción, nos propusimos estudiar el papel de Nkx2-1, Pax8 y el propio FoxE1 en la regulación de la expresión de FoxE1, tanto en células foliculares de tiroides como durante la diferenciación tiroidea.

En primer lugar se llevaron a cabo ensayos de EMSA con oligonucleótidos que contenían en sus secuencias los sitios de unión detectados *in silico* para Pax8 (Sitio 1: -279, Sitio 2: -845), Nkx2-1 (-3049) y FoxE1 (-261) en el promotor de FoxE1. Cuando se incubaron cada uno de estos oligonucleótidos con proteína recombinante de Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 se observó en todos los casos un retardo en la movilidad electroforética de estos oligonucleótidos (Fig. 18 A-D). Estos resultados confirman que los factores de transcripción tiroideos son capaces de unirse a sus secuencias consenso en el promotor de FoxE1. Para saber si esta unión era funcional nos propusimos estudiar si los factores Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 inducían la activación del promotor de FoxE1. Para ello se cotransfectaron en células Hela la construcción del promotor de FoxE1 (pFoxE1-3.1) junto con vectores de expresión de Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 tanto individualmente como en conjunto en todas las combinaciones posibles (Fig. 18 E). Tras analizar los resultados se observó que los tres factores de transcripción inducen la activación del promotor de FoxE1 de forma individual, siendo la activación inducida por la sobre-expresión de Pax8 la de mayor magnitud en comparación con la obtenida por FoxE1 y Nkx2-1. Además, atendiendo a los resultados obtenidos, se puede observar que la expresión conjunta de Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 establece una cooperación positiva sobre la activación del promotor de FoxE1, ya que se obtiene la mayor de las activaciones cuando se cotransfectaron los tres factores a la vez (Fig. 18 E).

Dado que el efecto individual más evidente sobre la activación del promotor de FoxE1 fue producido por la sobre-expresión de Pax8, nos propusimos estudiar el efecto directo de este factor de transcripción sobre la expresión de FoxE1. Para ello inhibimos la expresión de Pax8 mediante ensayos de RNA de interferencia (RNAi) en células PCCl3 y se analizaron los niveles proteicos de FoxE1 (Fig. 18 F). Como se puede observar, la inhibición parcial de la expresión de Pax8 dio lugar a un drástico descenso de los niveles de proteína de FoxE1, confirmando el papel fundamental de Pax8 en la inducción de la expresión de FoxE1.

RESULTADOS

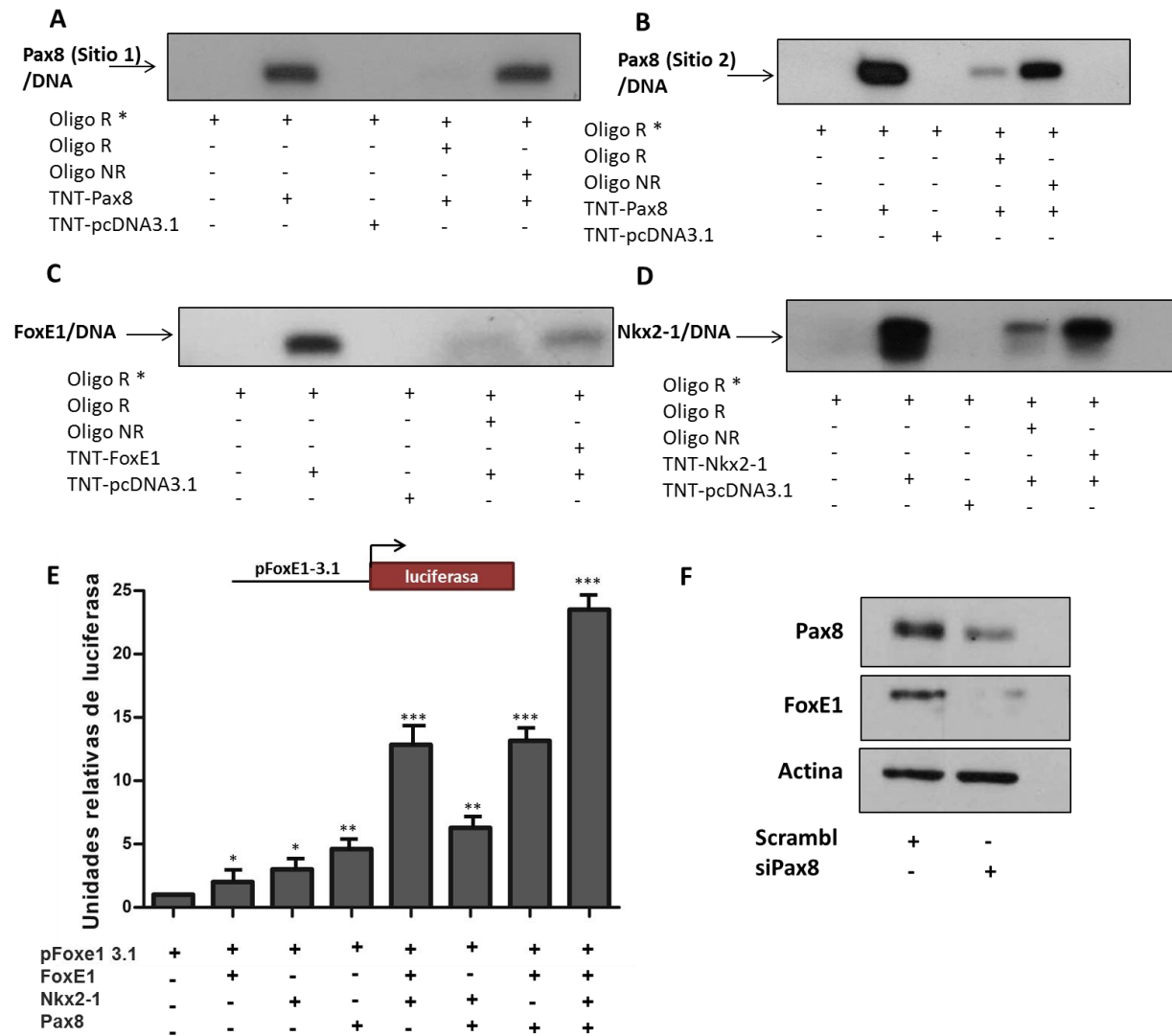


Figura 18. Función de los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 en la regulación de la expresión de FoxE1.

Paneles A-D: Los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizaron con los oligonucleótidos marcados radiactivamente con P^{32} conteniendo en su secuencia los sitios de unión de Pax8 (**A y B**), FoxE1 (**C**) y Nkx2-1 (**D**) detectados en el promotor de FoxE1. Los oligonucleótidos marcados (Oligo R*) fueron incubados en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de proteína recombinante TNT-Pax8 (**A y B**), TNT-FoxE1 (**C**) y TNT-Nkx2-1 (**D**). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con oligonucleótidos sin marcar relacionados (Oligo R) o no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso 50 veces con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel E:** Células Hela fueron co-transfectadas con 1,5 μ g de pFoxE1-3.1 y 1,5 μ g de CMV-FoxE1, pBS-Nkx2-1 y/o pcDNA3.1-Pax8 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron 48 horas en medio DMEM completo y transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. Los cambios fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***). **Panel F:** La expresión de Pax8 fue inhibida en células PCCl3 mediante la transfección con un vector de expresión de un siRNA específico (siPax8). Células PCCl3 transfectadas con los vectores siPax8 y siScramble fueron cultivadas en medio 6H y fueron recolectadas a las 48 horas para la detección de los niveles de proteína de FoxE1. Se analizó la expresión de Pax8 como control del funcionamiento del siRNA y de β -actina como control de carga.

Nuestros resultados demuestran que Nkx2-1 y Pax8 regulan la expresión de FoxE1 en células foliculares diferenciadas a través de la activación de su promotor; ello junto con el hecho descrito de que la expresión de FoxE1 está reducida en el primordio tiroideo de embriones de ratón sin expresión de Pax8 es una evidencia de la existencia de una posible regulación de la expresión de FoxE1 por Pax8 durante el desarrollo embrionario y antes de la diferenciación final de la célula folicular (Mansouri et al. 1998).

En base a lo expuesto anteriormente nos propusimos estudiar el papel de Nkx2-1 y Pax8 en la regulación de la expresión de FoxE1 durante la diferenciación tiroidea. Para ello se usó como modelo una línea celular de mESCs con expresión inducible por Doxíciclina de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8 siguiendo el protocolo de diferenciación a células foliculares de tiroides anteriormente descrito (Antonica et al. 2012). Se analizaron los niveles de mRNA de Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 a los tres días de tratamiento con Doxíciclina (Fig. 19 A-C), en ausencia (Fig. 19 A) o presencia de TSH o 8-Br-cAMP durante 7 días (Fig. 19 B) o 14 días (Fig. 19 C). Como se puede observar, el inicio de la expresión de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8 en células mESCs indiferenciadas fue suficiente para la inducción de la expresión de FoxE1 (Fig. 19 A), que se vio favorecida cuando, además de inducirse la expresión de Nkx2-1 y Pax8, se estimularon las células con TSH o se activó la vía del cAMP mediante el tratamiento con 8-Br-cAMP.

Estos resultados permiten confirmar que la expresión de FoxE1 está regulada por los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8 tanto en células foliculares diferenciadas como durante el la diferenciación tiroidea que tiene lugar durante el desarrollo embrionario. Así mismo es interesante destacar que los resultados demuestran que FoxE1 regula su propia expresión de forma positiva. Esta regulación de la expresión de FoxE1 por los factores de transcripción tiroideos está mediada por la unión de Nkx2-1, Pax8 y el propio FoxE1 a sus sitios consenso identificados en el promotor de FoxE1. Así mismo, los resultados evidencian que la TSH y la vía del cAMP favorecen la inducción de la expresión de FoxE1, lo cual permite confirmar el importante papel de la TSH y de esta vía en la regulación de la expresión de FoxE1 y en la diferenciación de la célula folicular tiroidea.

RESULTADOS

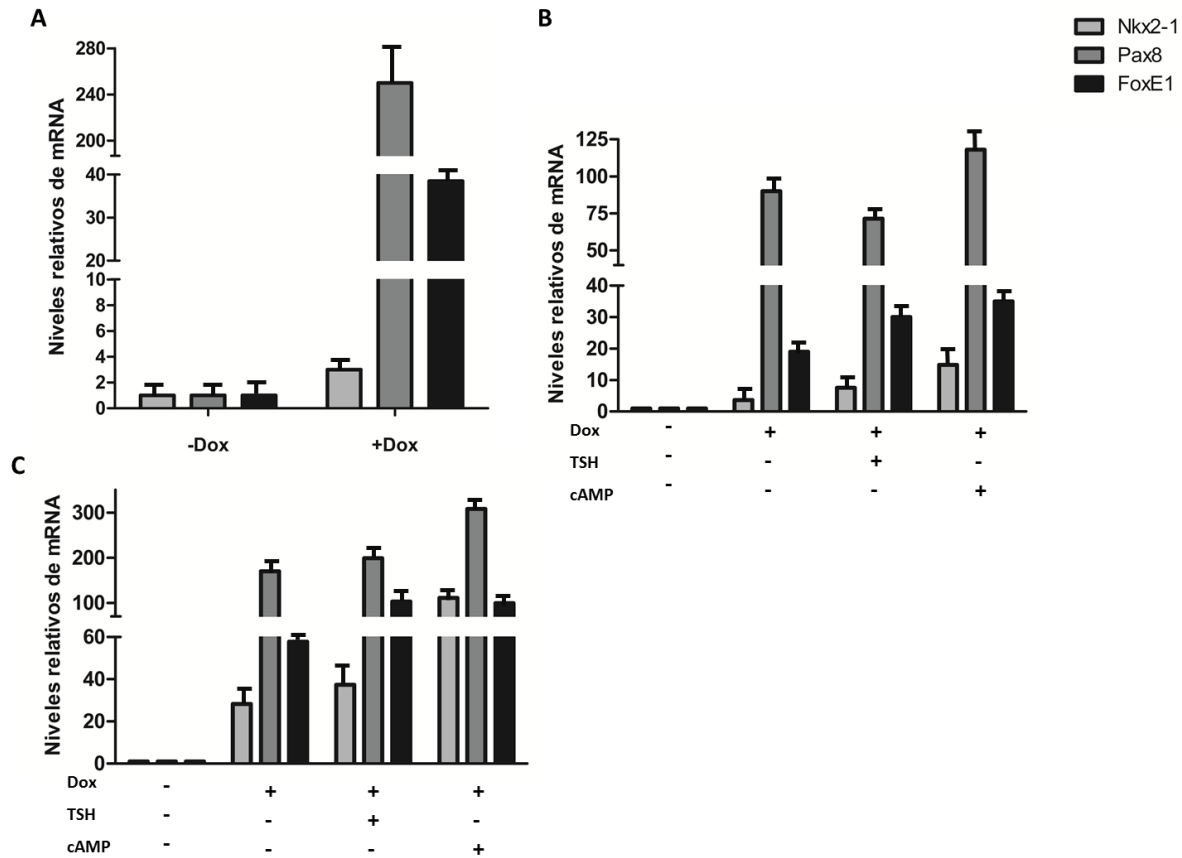


Figura 19. Inducción de la expresión de FoxE1 en mESCs. Las células mESCs con expresión inducible de Nkx2-1 y Pax8 se cultivaron en medio de mantenimiento previamente a la generación de los cuerpos embrioides. Tras 4 días, los cuerpos embrioides se recolectaron y se cultivaron en medio de diferenciación con o sin Doxyciclina durante 3 días. Pasado este tiempo las células fueron recolectadas (**A**). Las células se mantuvieron en medio de diferenciación con TSH o 8'-Br-cAMP durante 7 y 14 días tras lo cual se recolectaron (**B y C respectivamente**). El RNA fue extraído y retro-transcrito para la posterior detección mediante qPCR de los niveles del mRNA de FoxE1, Pax8 y Nkx2-1 relativos a la expresión de la β -actina. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes.

1.6-. FoxE1 coopera con NF1/CTF para activar la expresión de NIS en la célula folicular diferenciada de tiroides.

El papel de FoxE1 en la regulación de la expresión de genes implicados en la diferenciación tiroidea ha sido demostrado anteriormente. Se ha descrito que la expresión de Tg y TPO está regulada por la unión de FoxE1 a sus promotores, induciendo su actividad y aumentando su expresión (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993). En el caso de la regulación de la expresión de TPO se demostró que FoxE1 se unía al promotor formando un complejo con el factor de transcripción NF1/CTF (Ortiz et al. 1999). Sin embargo, la unión de FoxE1 a otros promotores de genes de diferenciación tiroidea y por consiguiente su función en la regulación de la expresión de estos genes ha sido poco estudiada hasta la fecha. En este sentido, el simportador de Na^+/I^- (NIS) es fundamental para la correcta diferenciación y función de la célula folicular tiroidea. Su expresión

está regulada por los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8 (Ohno et al. 1999), así como por los reguladores de la función tiroidea TSH, IGF1 y TGF β . Dado el papel de FoxE1 en la diferenciación tiroidea, nos propusimos estudiar su función en la regulación de NIS, y si esta posible regulación ocurría en cooperación con el factor de transcripción NF1/CTF, como había sido descrito anteriormente para la regulación de TPO.

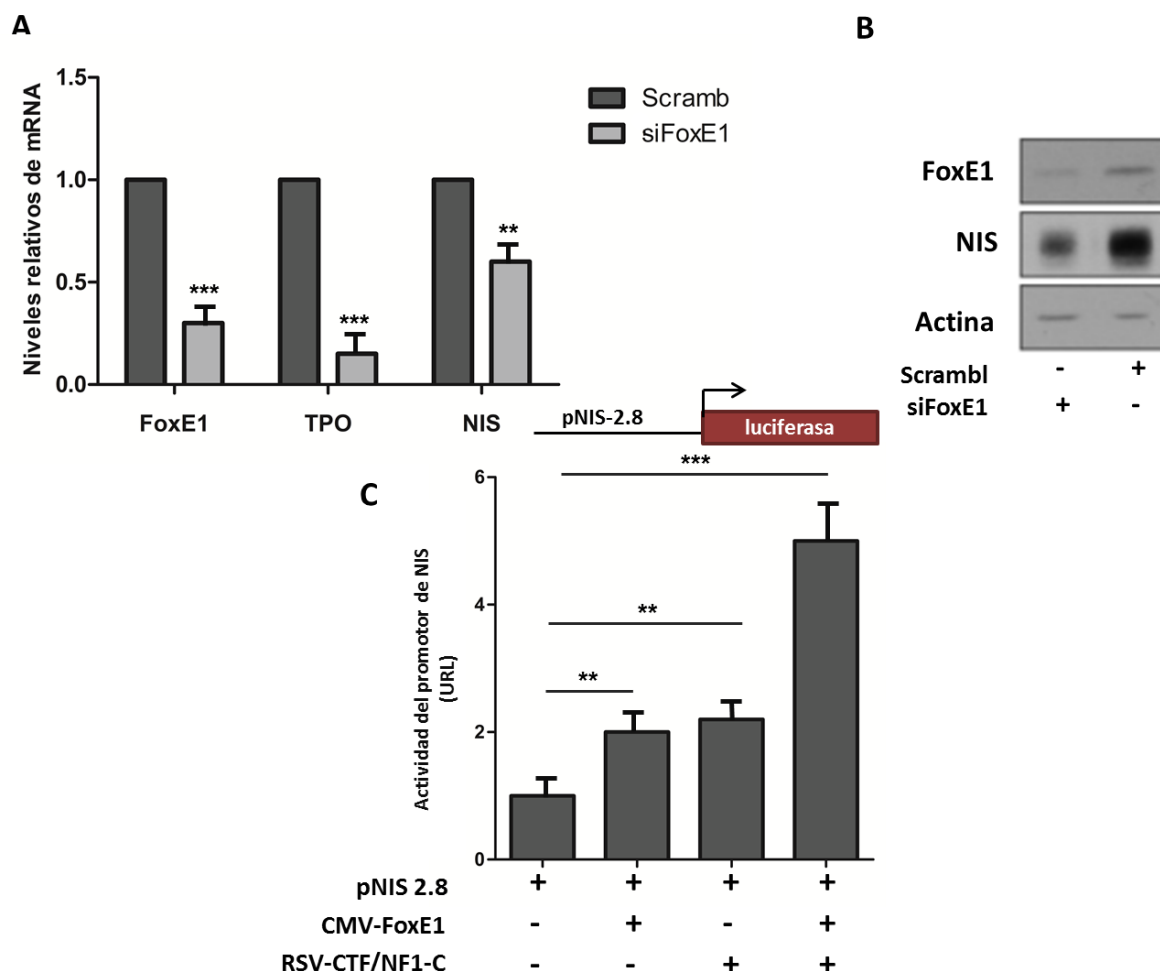


Figura 20. Papel de FoxE1 en la regulación de la expresión de NIS. : La expresión de FoxE1 fue inhibida en células PCCl3 cultivadas en medio 6H mediante la transfección de un vector de expresión con un siRNA específico (siFoxE1) y como control un siScrambl. **Panel A:** Para la detección de los niveles de mRNA de NIS las células fueron recolectadas a las 24 horas. Los valores de expresión de TPO se midieron como control positivo de la función de FoxE1 en la regulación de un gen diana. **Panel B:** A las 48 horas las células fueron recolectadas para la para la detección de los niveles de proteína de NIS. Se detectó la expresión de FoxE1 como control del funcionamiento del siRNA y de β -actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes. **Panel C:** Células Hela fueron co-transfectadas con 1,5 μ g de rNUE2.8-NIS y 1,5 μ g de CMV-FoxE1 y RSV-CTF/NF1 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron 48 horas en medio DMEM completo y transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Los cambios fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***)

RESULTADOS

El análisis *in silico* de la secuencia del NUE de NIS, principal región reguladora del promotor de este gen, demostró la presencia de un sitio consenso para FoxE1 que se encontraba a 10 pares de bases de distancia de un sitio consenso para el factor de transcripción NF1/CTF (Fernandez et al. 2013). Esta cercanía física de los dos sitios consenso es fundamental para la unión física de FoxE1 y NF1/CTF a la hora de formar el complejo que regule la activación del promotor. Posteriormente inhibimos la expresión de FoxE1 mediante ensayos de RNA de interferencia (RNAi) en células PCCl3 y se analizaron los niveles de expresión de NIS. El análisis de los niveles de mRNA de estas células demostró que los niveles de NIS estaban reducidos en células en las que se había inhibido la expresión de FoxE1. Así mismo, como control positivo del experimento, se confirmó que los niveles de TPO estaban reducidos en células en las que se había inhibido la expresión de FoxE1 (Fig. 20 A). Estos resultados se obtuvieron también a nivel de proteína (Fig. 20 B), confirmando que FoxE1 está activando la expresión de NIS.

Con el objetivo de estudiar si la regulación de la expresión de NIS por FoxE1 tenía lugar a través de la cooperación de FoxE1 y NF1/CTF mediante la regulación de su promotor, se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células Hela con la construcción del promotor completo de NIS conteniendo el NUE junto con vectores de expresión de FoxE1 y NF1/CTF (Fig. 20 C). Se observó que la expresión de FoxE1 y NF1/CTF individualmente induce la actividad del promotor de NIS aproximadamente dos veces en ambos casos. Sin embargo, cuando se sobre-expresan ambos factores de transcripción de forma simultánea se observa que la activación del promotor de NIS aumentó hasta cinco veces. Estos resultados demuestran que FoxE1 regula la expresión de NIS a través de la unión a su sitio consenso detectado en el NUE y que dicha regulación está mediada y favorecida por la cooperación con NF1/CTF.

2-. Expresión, regulación y función de Sox9 en la diferenciación de las células foliculares de tiroides.

2.1-. Sox9 se expresa en el tiroides embrionario de ratón a partir de E10.5

La familia de proteínas Sox se compone de aproximadamente veinte factores de transcripción que contienen como característica común un dominio de alta movilidad (HMG) que está muy conservado evolutivamente. Se ha relacionado a esta familia de factores de transcripción con la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario en numerosos tejidos (Kamachi and Kondoh 2013). Concretamente, el factor de transcripción Sox9 juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario en la diferenciación de tejidos de origen endodérmico como el

páncreas o el hígado (Kawaguchi 2013). Dado que las señales moleculares y otros factores de transcripción que pudieran estar implicados en la especificación tiroidea, y por consiguiente en la regulación de la expresión de los factores de transcripción tiroideos en las fases tempranas del desarrollo embrionario, son aún poco conocidas, nos propusimos estudiar la expresión de Sox9 durante el desarrollo embrionario de tiroides, debido al origen endodérmico de esta glándula.

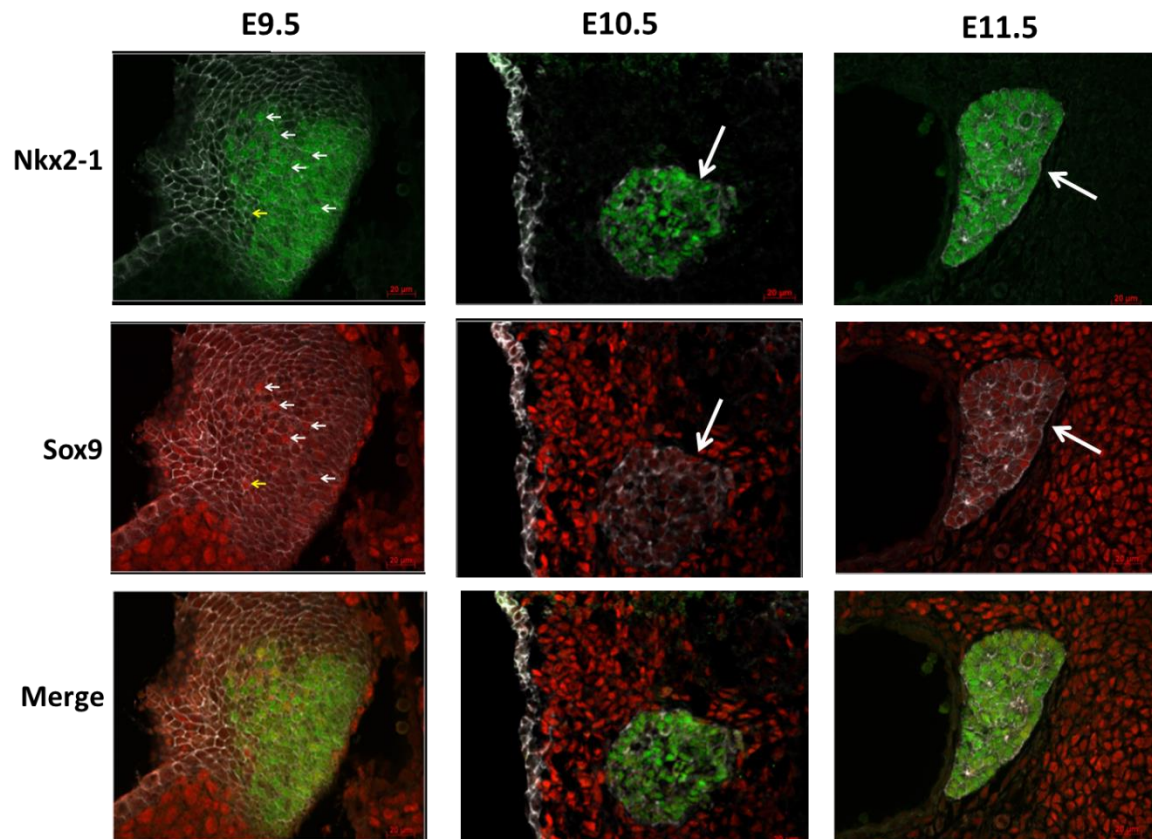


Figura 21.- Inmunofluorescencia de Sox9 en el tiroides embrionario de ratón. Se obtuvieron secciones sagitales de glándulas tiroideas pertenecientes a embriones de ratón a diferentes días de desarrollo embrionario. Posteriormente se detectó la expresión de Nkx2-1 y Sox9 mediante inmunofluorescencia. Las flechas blancas indican la localización del primordio tiroideo. Se usó el objetivo de 40X.

En primer lugar nos propusimos estudiar la expresión temporal de Sox9 en el tiroides embrionario. Se realizaron cortes sagitales de tiroides de ratón obtenidos a diferentes días de desarrollo embrionario: E9.5, E10.5 y E11.5. Se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de Sox9 usando como control de especificación de tiroides la expresión de Nkx2-1. Se pudo observar que, como se ha descrito, a E9.5 la expresión de Nkx2-1 es evidente en un grupo de células del endodermo faríngeo. Estas células son los precursores tiroideos a partir de las cuales se generará la glándula tiroidea adulta. La expresión de Sox9 podía ser anterior o posterior a la especificación tiroidea, ya que aún son desconocidos los factores de transcripción que pidieran estar controlando la expresión de los factores de transcripción tiroideos, entre ellos Nkx2-1, en fases previas a la especificación. Cuando se observó la expresión de Sox9 en estos precursores, se observó que a

RESULTADOS

E9.5 la expresión de este factor de transcripción es casi indetectable, pudiéndose solo observar de forma débil en un número muy limitado de células. Sin embargo, en el mesénquima adyacente al primordio tiroideo se observó una evidente y elevada expresión de Sox9 (Fig-. 21). A medida que avanzó el desarrollo embrionario se observó un aumento progresivo de la expresión de Sox9 en el primordio tiroideo. A E 11.5 todas las células que conforman el primordio tiroideo expresaban de forma evidente Sox9. La expresión Sox9 en el mesénquima que rodea al primordio tiroideo fue superior en las diferentes etapas del desarrollo embrionario en las que se detectó la expresión de Sox9 (Fig-. 21).

Debido a la gran homología de secuencia que existe entre los factores de transcripción de la familia Sox, y para evitar posibles señales debidas a inespecificidades, nos propusimos descartar que la señal detectada en las anteriores inmunofluorescencias de cortes de tiroides embrionarios no se debía a la expresión de otro factor de la familia Sox, como por ejemplo Sox10, que presenta una gran homología con Sox9 ya que pertenecen al mismo grupo E de genes Sox (Weider and Wegner 2017). Para ello se usaron ratones transgénicos que expresaban el factor de transcripción Sox9 fusionado a la proteína fluorescente verde GFP. En primer lugar se extrajeron tiroides de ratones a E16.5. Mediante microscopia de fluorescencia, se detectó la señal de GFP (Fig-. 22 A). Se observó una intensa señal GFP, lo que significa una alta expresión de Sox9, en los lóbulos tiroideos embrionarios. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia de cortes sagitales de tiroides de embriones de ratón a E16.5 para la detección de la expresión de GFP y de Sox9 (Fig-. 22 B). Tal y como se puede observar, las células epiteliales formando folículos mostraban una señal intensa de expresión de Sox9, concretamente con localización nuclear. Estos resultados confirman que Sox9 se expresa en el tiroides embrionario, concretamente en las células foliculares, y que esta expresión aumenta a medida que avanza el desarrollo embrionario.

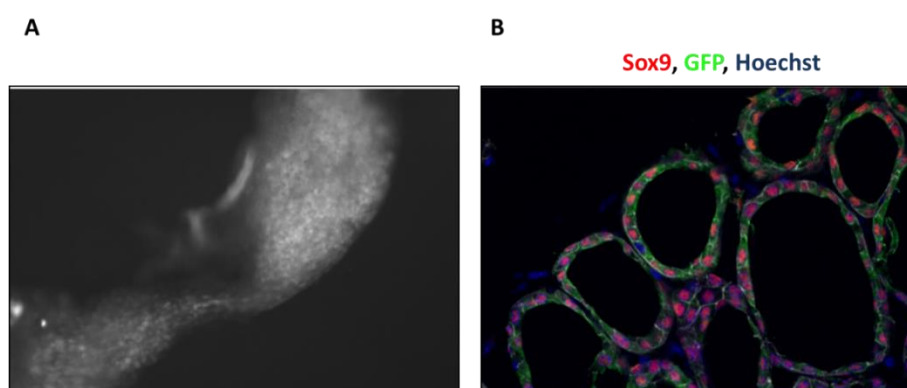


Figura 22-. Expresión de Sox9-GFP en el tiroides embrionario de ratón. Panel A: Lóbulo tiroideo aislado de ratón embrionario a E16.5. La señal GFP fue detectada mediante un microscopio de fluorescencia con objetivo 20X. **Panel B:** Se obtuvieron secciones sagitales de glándulas tiroideas pertenecientes a ratones en esa misma edad embrionaria. Posteriormente se detectó la expresión de Sox9 y GFP mediante inmunofluorescencia. Se usó un microscopio confocal con el objetivo de 40X.

2.2-. Sox9 se expresa en la célula folicular del tiroides adulto

Tras demostrar la expresión de Sox9 en el tiroides embrionario, nos planteamos estudiar si dicha expresión era un acontecimiento restringido al desarrollo embrionario o continuaba en las células foliculares del tiroides adulto.

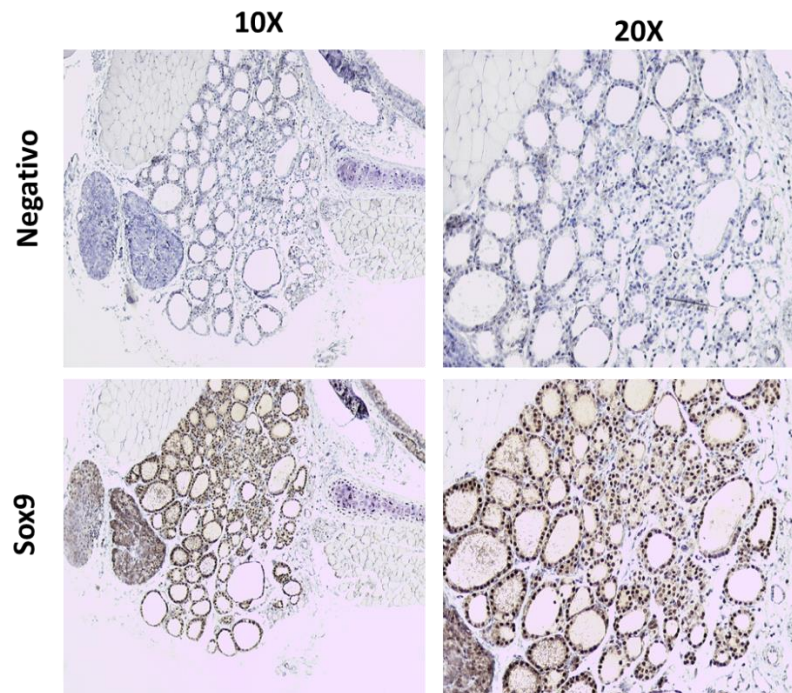


Figura 23-. Inmunodetección de Sox9 en el tiroides de ratón adulto. Se obtuvieron secciones sagitales de glándulas tiroideas pertenecientes a ratones de 2 meses de edad. Posteriormente se detectó la expresión de Sox9 mediante inmunohistoquímica y se contratiñeron las secciones con hematoxilina. Se usaron objetivos 10X y 20X.

Para ello se hicieron cortes sagitales de tiroides de ratón adulto de dos meses de edad y se detectó por inmunohistoquímica la expresión de Sox9 (Fig. 23). Como se puede observar en las micrografías tomadas con microscopio óptico, Sox9 se expresa en las células foliculares del tiroides del ratón adulto, localizándose principalmente en los núcleos de estas células. Se observa de forma evidente que las células que se encuentran entre los folículos tiroideos, como pueden ser las células C o del tejido conjuntivo, no expresan Sox9. En base a estos resultados se puede concluir que Sox9 es un factor de transcripción con una expresión evidente tanto en el tiroides embrionario como en la etapa adulta, localizándose su expresión a las células foliculares.

2.3-. Análisis *in silico* del promotor de Sox9

Una vez demostrada la expresión de Sox9 en el tiroides embrionario y en el adulto, nos propusimos estudiar la regulación de su expresión así como su posible función en la regulación de la expresión de genes implicados en la diferenciación tiroidea.

En primer lugar analizamos *in silico* una secuencia de 1700 pares de bases corriente arriba del inicio de la transcripción de Sox9 (Fig-. 24). En dicha secuencia se identificaron sitios de unión para los tres factores de transcripción tiroideos: Nkx2-1 (posición -328 y -1252), Pax8 (Posición -292) y FoxE1 (Posición -1169 y posición -1514). Además, se encontró en la secuencia analizada un sitio de unión para el propio Sox9 en la posición -1654. Así mismo se encontraron elementos de unión a proteínas Smads (Posición -320, posición -338 y posición -1315). Debido al papel crucial que juega la vía del cAMP en la señalización por TSH y por tanto en la regulación de la expresión génica en la célula folicular tiroidea, ha sido muy interesante la identificación de un sitio CRE en el promotor de Sox9, concretamente en la posición -528.

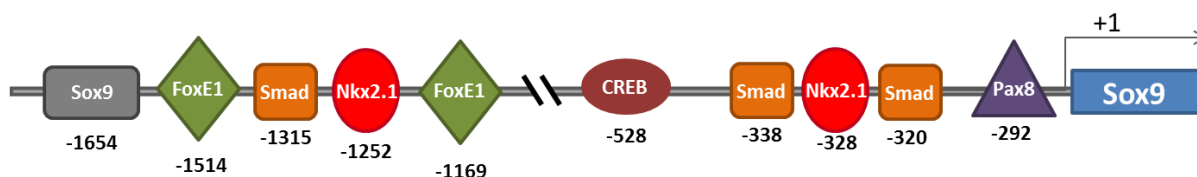


Figura 24-. Representación esquemática de la región promotora del gen Sox9 de rata con los sitios de unión de diferentes factores de transcripción identificados en su secuencia.

La identificación de sitios de unión para los tres factores de transcripción tiroideos en el promotor de Sox9, así como la presencia en dicha secuencia de un sitio CRE, sugiere Sox9 pudiera estar jugando un papel importante en la red transcripcional que regula la diferenciación de la célula folicular tiroidea. Esto se ve reforzado por la presencia de los tres elementos de unión de proteínas Smads, efectores finales de la vía de señalización de TGFβ. Dada la información obtenida *in silico*, nos propusimos estudiar el papel funcional de Sox9 en la diferenciación folicular tiroidea, así como la regulación de su expresión por los factores de transcripción tiroideos y las señales moleculares implicadas en la fisiología tiroidea.

2.4-. La expresión de Sox9 en la célula folicular tiroidea está regulada por TSH e IGF1.

La identificación en la secuencia del promotor de Sox9 de un sitio CRE sugiere que la vía del cAMP/PKA pudiera estar implicada en la regulación de su expresión. En base a estas evidencias, y teniendo en cuenta el papel fundamental de la TSH y el IGF1 en la diferenciación y función del tiroides, nos propusimos estudiar la regulación de la expresión de Sox9 por ambos ligandos.

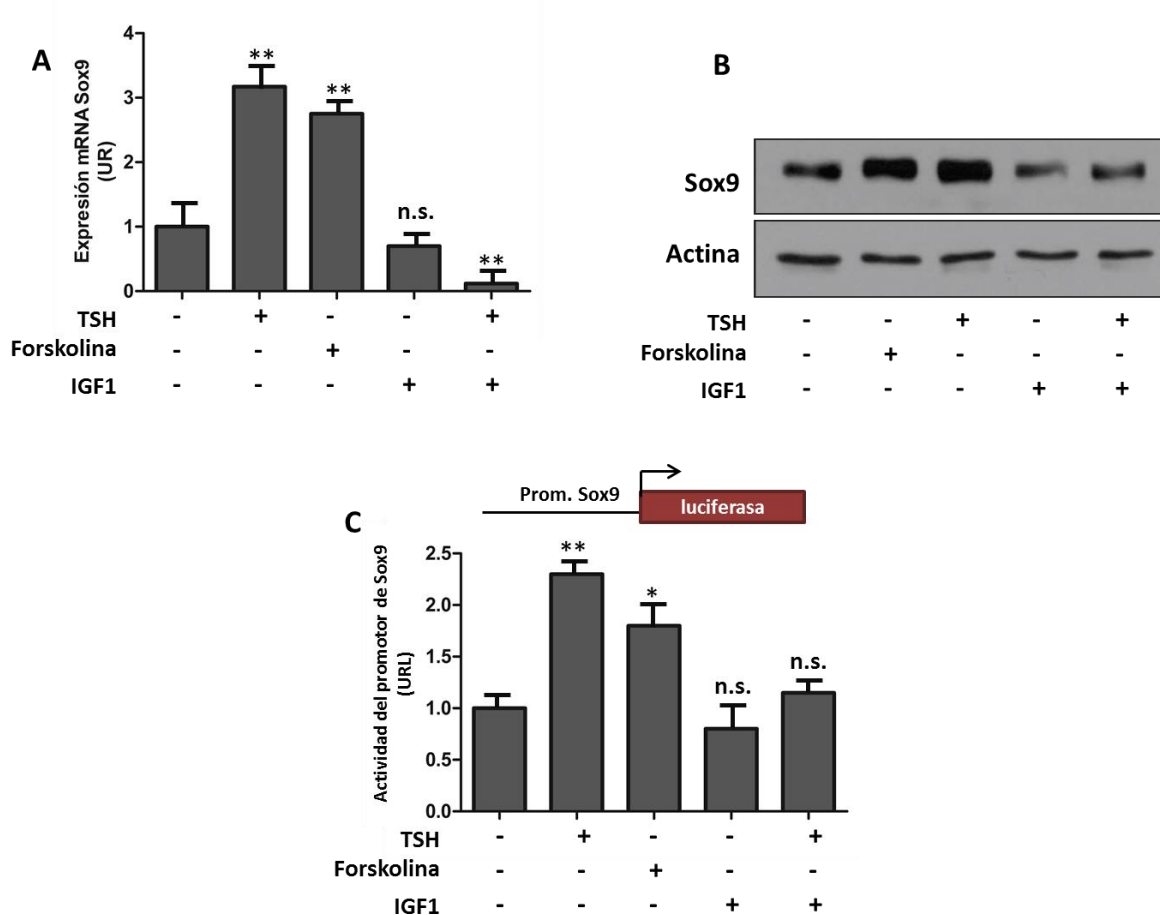


Figura 25-. Efecto de la TSH e IGF1 en la expresión del Sox9. Las células PCCl3 fueron cultivadas 48 horas en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en este medio o fueron tratadas con los diferentes estímulos indicados en cada caso 16 horas (**A**) o 24 horas (**B y C**). **Panel A:** Niveles del mRNA de Sox9 relativos a la expresión de la β -actina. **Panel B:** Niveles de proteína Sox9 determinados a partir de extractos totales de proteína de células PCCl3. Se detectaron los niveles de β -actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Actividad del promotor de Sox9 en células PCCl3 transfectadas 1,5 μ g del plásmido hSox9prom-Luc y 50 ng de pRL-CMV. Las células transfectadas fueron cultivadas 24h en medio 6H. Seguidamente se mantuvieron 48 horas en medio 4H y tratadas 24 horas con los estímulos indicados tras lo cual fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad del promotor se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Los cambios con respecto a las células mantenidas en medio basal fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**): $p < 0,001$ (***)).

RESULTADOS

Se usaron células PCCl3 que, tras 48 horas en medio basal 4H, se trataron con TSH e IGF1, así como con Forskolina para activar de forma específica la vía del cAMP. Tras 16 horas o 24 horas de tratamiento, para el análisis de los niveles de mRNA o proteína respectivamente, se observó que tanto la TSH como la Forskolina aumentaron los niveles de mRNA y de proteína de Sox9. Sin embargo, el IGF1 no tuvo ningún efecto por sí mismo sobre la expresión de Sox9, aunque cuando se estimularon las células con TSH e IGF1 de forma simultánea se observó que IGF1 inhibía el efecto inductor que la TSH ejercía sobre la expresión de Sox9 tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig-. 25 A y B). Para evaluar si el efecto de la TSH y de la vía de cAMP sobre la expresión de Sox9 estaba ocurriendo a nivel transcripcional se realizaron ensayos de transfección transitoria en células PCCl3 de una construcción del promotor de Sox9 unido a luciferasa (Fig-. 25 C). Las células transfectadas fueron mantenidas 48 horas en medio 4H y posteriormente tratadas 24 horas con TSH, IGF1 y Forskolina. Tras la recolección de las células se observó que tanto la TSH como la Forskolina incrementaron de forma significativa la actividad del promotor de Sox9. Por el contrario, el IGF1 no tuvo ningún efecto por sí mismo, aunque inhibió la actividad del promotor de Sox9 inducida por la TSH.

En base a estas evidencias, se estudió la expresión y la localización subcelular de Sox9 en células PCCl3 tratadas con TSH e IGF1 de forma individual y de forma conjunta. Para ello se determinó la expresión de Sox9, así como de Pax8, por inmunofluorescencia (Fig-. 26). Mediante microscopía confocal, usando un aumento de 63 veces, se tomaron fotografías que muestran que la expresión de Sox9 así como su localización en el núcleo se induce por TSH. Esta inducción de la expresión por TSH, aunque no la localización nuclear de Sox9, se inhibió cuando se estudió la fluorescencia de Sox9 en células tratadas con IGF1 y TSH.

Estos resultados permiten concluir que la expresión de Sox9 está regulada por TSH e IGF1, dos de los principales estímulos implicados en la fisiología tiroidea. Se puede confirmar que el efecto de la TSH ocurre a nivel transcripcional ya que aumenta la actividad del promotor de Sox9, y que IGF1 inhibe dicha activación así como la expresión de Sox9 tanto a nivel de mRNA como de proteína. Estos resultados, unidos a los mostrados anteriormente en los que se confirma la expresión de Sox9 en tiroides embrionario y adulto, sugieren que el factor de transcripción Sox9 podría jugar un papel determinante en la fisiopatología tiroidea.

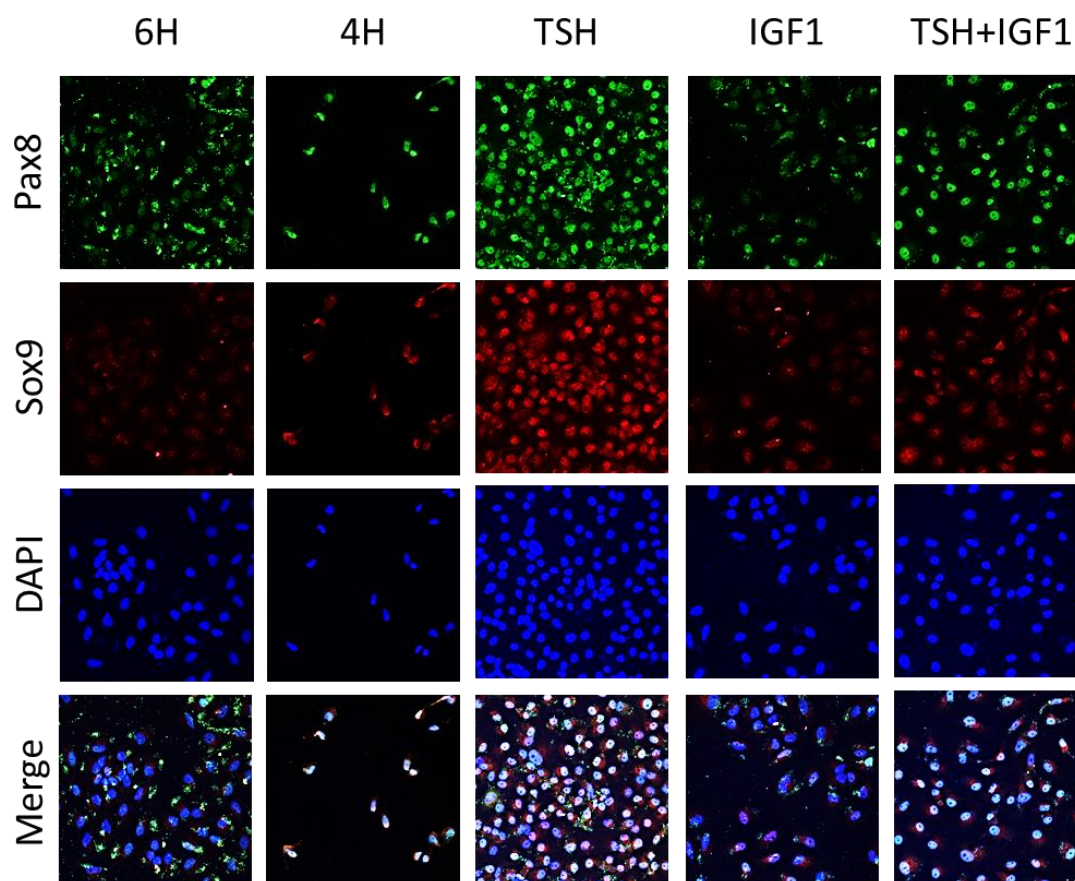


Figura 26.- Efecto de la TSH y el IGF1 sobre la expresión y la localización subcelular de Sox9. Células PCCl3 sembradas en cubreobjetos fueron cultivadas en medio completo (6H) o en medio basal (4H) 48 horas y posteriormente tratadas 24 horas con TSH, IGF1 o TSH+IGF1. Se determinó la expresión de Sox9 y Pax8 mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de Sox9 y Pax8 y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

2.5.- La TSH induce su efecto sobre la expresión de Sox9 a través de la vía del cAMP/PKA/CREB

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que TSH induce la expresión de Sox9 a nivel transcripcional y a través de la vía del cAMP. Teniendo en cuenta estos datos, decidimos estudiar el papel de CREB, efector final de la vía del cAMP/PKA, en la expresión de Sox9 en células foliculares de tiroides.

En primer lugar se analizaron los niveles de proteína de Sox9 en células PCCl3 mantenidas 48 horas en medio 4H y tratadas con TSH y Forskolina, y además en presencia o ausencia del inhibidor H89, durante 24 horas (Fig.-27 A). Los resultados mostraron que en las células pre-incubadas con H89 la inducción de la expresión de Sox9 ejercida por la TSH y la Forskolina era inhibida. Este efecto del H89 era reproducido a nivel transcripcional ya que este inhibidor anuló el efecto inductor que la

RESULTADOS

TSH y Forskolina ejercen sobre el promotor de Sox9 (Fig. 27 B). El conjunto de estos datos sugieren que la PKA es la mediadora de la acción de la TSH y el cAMP sobre la inducción transcripcional de Sox9. Sin embargo, se puede observar que H89 no consiguió inhibir completamente el efecto de la TSH y la Forskolina, lo que sugiere que otras vías activadas por la TSH, como la PI3K, pudieran estar participando en la regulación de la expresión de Sox9 por la TSH.

Posteriormente estudiamos si la activación del promotor de Sox9, y por consiguiente su expresión, por la vía del cAMP/PKA, estaba mediada por la unión de CREB al sitio CRE identificado en la secuencia del promotor de Sox9. Para ello se llevaron a cabo ensayos EMSA usando un oligonucleótido conteniendo el sitio CRE del promotor de Sox9. La incubación del oligonucleótido con CREB recombinante dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética del oligonucleótido, lo cual permite concluir que CREB se unen a ese sitio CRE identificado *in silico* (Fig. 27 C). Con el propósito de evaluar el efecto de la unión de CREB al sitio CRE se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células Hela de la construcción del promotor de Sox9 unido a luciferasa junto con un vector de expresión de CREB. Se observó que la sobre expresión de CREB indujo más de 6 veces la actividad del promotor de Sox9 en comparación con células sin transfectar con CREB (Fig. 27 D). Estos datos confirman el sitio CRE identificado en el promotor de Sox9 es funcional y media la respuesta a TSH a través de la vía cAMP/PKA/CREB.

Para evaluar definitivamente el efecto de CREB sobre la expresión de Sox9 se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la expresión de CREB en células PCC13 mediante el uso de siRNAs específicos de Sox9. Las células transfectadas con el siRNA de CREB fueron recogidas a las 16, 24 y 48 horas para evaluar los niveles de mRNA de Sox9 (Fig. 27 E) y a las 48 horas para medir sus niveles proteicos (Fig. 27 F). Los niveles de expresión de CREB se determinaron como control de la eficiencia del silenciamiento. Como se puede observar, tanto los niveles de mRNA como de proteína de Sox9 disminuyeron de forma significativa en células en las que se había inhibido la expresión de CREB. Esta reducción en los niveles de expresión de Sox9 fue un 50% mayor en aquellas células en las que se había inhibido la expresión de CREB durante 48 horas. Estos resultados en su conjunto demuestran el papel fundamental de CREB en la activación de la expresión de Sox9 en respuesta a TSH a través de la vía del cAMP/PKA.

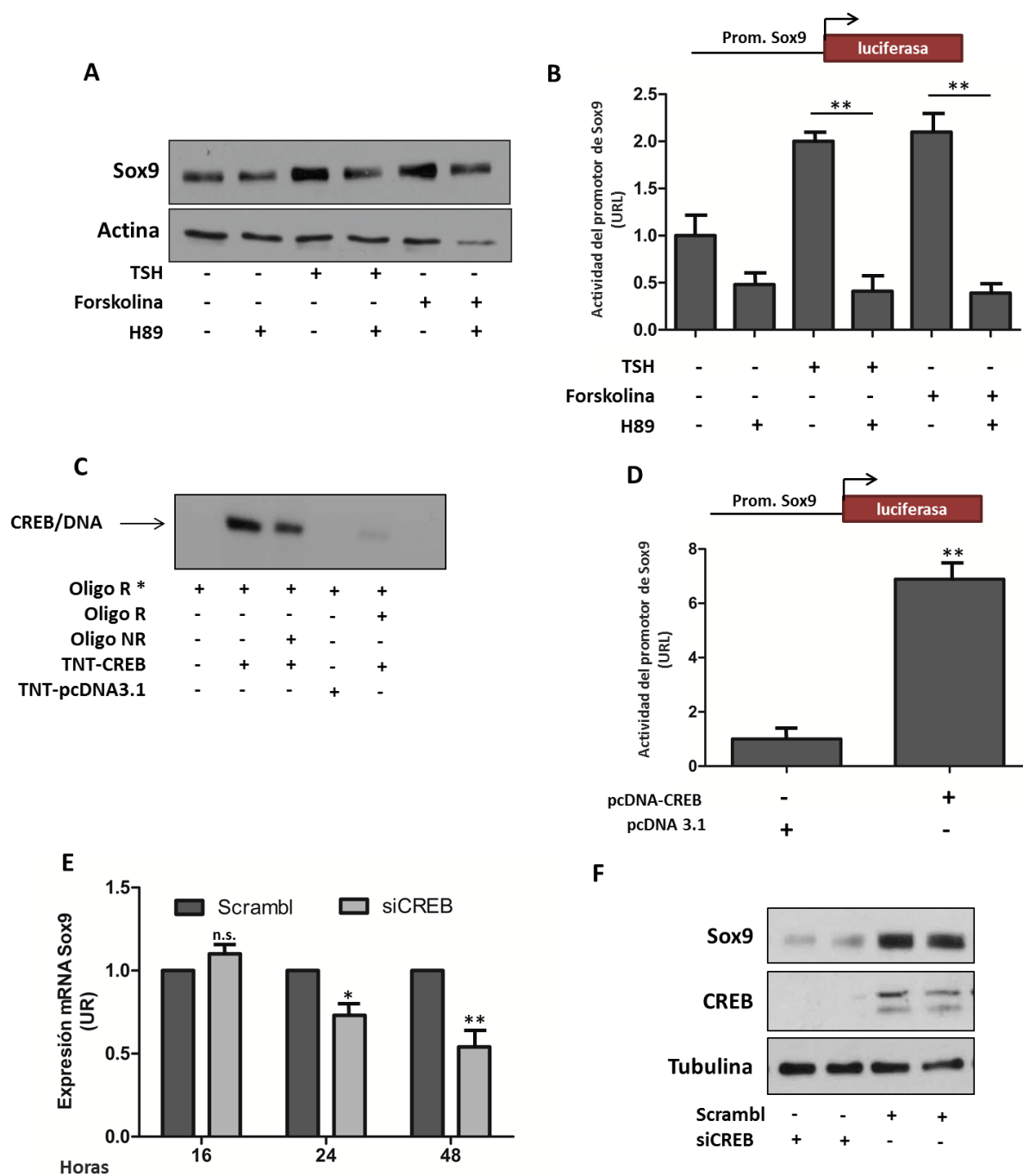


Figura 27-. Papel de la vía del cAMP/PKA/CREB en la inducción de la expresión de Sox9 por TSH. **Panel A:** Las células PCCl3 fueron cultivadas 48 horas en medio 4H y posteriormente tratadas 24 horas con los diferentes estímulos indicados en cada caso. El inhibidor H89 se añadió al medio 1,5 h antes de los tratamientos con TSH y Forskolina. Se obtuvieron extractos totales de proteína y se analizaron mediante Western-blot los niveles de Sox9 en cada tratamiento. Se analizaron los niveles de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel B:** Células PCCl3 fueron transfectadas con 1,5µg del plásmido hSox9prom-Luc y 50 ng de pRL-CMV. Las células transfectadas fueron cultivadas 24h en medio 6H. Seguidamente se mantuvieron 48 horas en medio 4H y tratadas 24 horas con los tratamientos indicados tras lo cual fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad del promotor se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. **Panel C:** El ensayo de cambio de movilidad electroforética se realizó con el oligonucleótido marcado radiactivamente con P^{32} conteniendo en su secuencia el elemento de respuesta a cAMP (CRE) identificado en el promotor de Sox9. El oligonucleótido marcado (Oligo R*) fue incubado en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de CREB recombinante (TNT-CREB). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al

RESULTADOS

oligonucleótido marcado. **Panel D:** Células Hela fueron transfectadas con 1,5µg de hSox9prom-Luc, 1,5µg de pcDNA3.1-CREB y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM completo 48 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. **Panel E y F:** La expresión de CREB fue inhibida en células PCCI3 mediante la transfección de un vector de expresión de un siRNA específico (siCREB). Células PCCI3 transfectadas con los vectores siCREB y siScramble fueron cultivadas en medio 6H y fueron recolectadas a las 16, 24 y 48 horas para la detección de los niveles de mRNA (**E**) o a las 48 horas para la detección de los niveles de proteína (**F**). Se detectó la expresión de CREB como control del funcionamiento del siRNA y de α-tubulina como control de carga. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**): $p < 0,001$ (***).

2.6-. TGFβ inhibe el efecto inductor de TSH sobre la expresión de Sox9

Como ha sido descrito anteriormente, el TGFβ, así como sus receptores y las proteínas Smad efectoras finales de su vía de señalización, se expresan en las células foliculares de tiroides. Trabajos previos de nuestro laboratorio habían descrito que el TGFβ inhibe la expresión de NIS inducida por TSH mediante un mecanismo basado en la reducción de la expresión de Pax8 y en la inhibición de la unión de este factor de transcripción a su secuencia consenso en el promotor de NIS (Costamagna et al. 2004). Así mismo, resultados obtenidos en esta tesis y descritos anteriormente han aportado evidencias claras sobre el papel de TGFβ en la regulación de FoxE1. Basándonos en estas evidencias, nos propusimos estudiar el papel del TGFβ en la regulación de la expresión de Sox9.

En primer lugar se cultivaron células PCCI3 48 horas en medio 4H y seguidamente se trataron con TSH y/o TGFβ. Tras 16 o 24 horas de tratamiento se analizaron los niveles de mRNA y proteína de Sox9 (Fig-. 28 A y B respectivamente). Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento con TSH indujo la expresión de Sox9, tanto a nivel de mRNA como de proteína, mientras que el TGFβ no tuvo ningún efecto en sí mismo. Sin embargo esta citoquina inhibió el efecto estimulador de la TSH. Este mismo efecto se observó cuando se analizó la presencia de Sox9 por inmunofluorescencia en células PCCI3 mantenidas en 4H y tratadas con TSH y TGFβ (Fig-. 28 C). Estos resultados ponen de manifiesto que el TGFβ inhibe el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de Sox9.

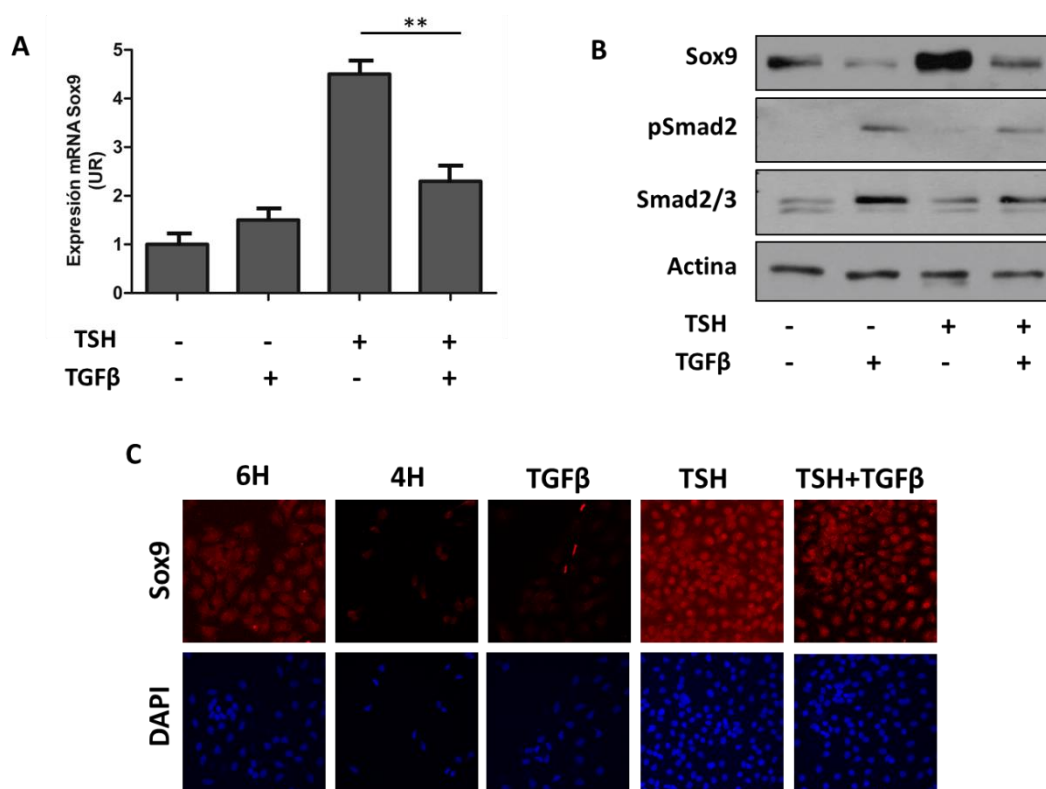


Figura 28-. Efecto del TGFβ sobre la activación de la expresión de Sox9 inducida por TSH. Las células PCCl3 fueron cultivadas en placas (**A y B**) o cubreobjetos (**C**) durante 48 horas en medio 4H y posteriormente tratadas con los diferentes ligandos indicados en cada caso 16 horas (**A**) o 24 horas (**B y C**). **Panel A:** Los niveles del mRNA de Sox9 relativos a la expresión de la β-actina fueron medidos por RT-qPCR. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**): $p < 0,001$ (***). **Panel B:** Se obtuvieron extractos totales de proteína de células PCCl3 y se analizaron mediante Western-blot los niveles de Sox9 en cada tratamiento. Se detectaron los niveles de pSmad2 y Smad2/3 como control de activación de la vía y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Se determinó la expresión de Sox9 mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de Sox9 y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

Este efecto tiene lugar a nivel transcripcional ya que se obtuvieron los mismos resultados cuando se transfectó el promotor de Sox9 en células PCCl3 y se trataron con TSH y TGFβ (Fig.-29 A). Para estudiar si el efecto inhibitor de TGFβ sobre la expresión de Sox9 inducida por la TSH estaba mediado por las proteínas Smads, efectores finales de la vía de señalización de TGFβ, se realizó un ensayo de EMSA con un oligonucleótido que contenía en su secuencia el elemento de unión de proteínas Smad detectado en el promotor de Sox9, concretamente en la posición -338 (Fig.- 29 B). La incubación de este oligonucleótido con Smad3 recombinante dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética de dicho oligonucleótido, lo cual nos permite afirmar que Smad3 se unía de forma específica a dicha secuencia del promotor de Sox9 (Fig.- 29 B). Posteriormente

RESULTADOS

estudiamos si la unión de las proteínas Smads al promotor de Sox9 afectaba a la activación inducida por la TSH. Para ello se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células PCCl3 de la construcción promSox9-luc junto con vectores de expresión de Smad3 y Smad4 (Fig-. 29 C). Tras 48 horas en medio 4H las células fueron tratadas con TSH. Se observó que la inducción de la actividad del promotor de Sox9 producida por la TSH se vio inhibida cuando se sobre expresó Smad3 y Smad4 de forma individual o conjunta.

Todos estos resultados en su conjunto permiten concluir que TGFβ inhibe la activación de la expresión de Sox9 inducida por TSH a nivel transcripcional.

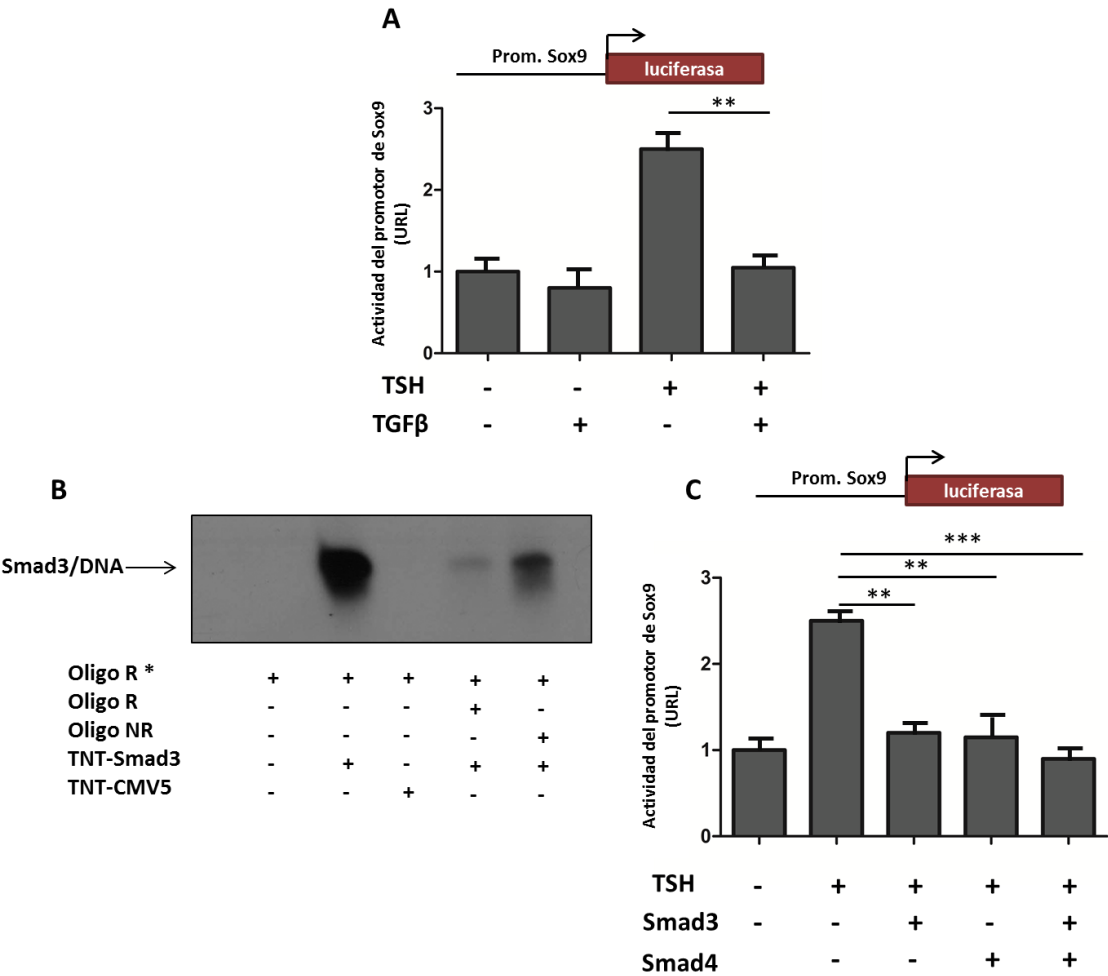


Figura 29-. Papel de la vía de las Smads en la inhibición por TGFβ del efecto de la TSH sobre la expresión de Sox9.
Panel A: Células PCCl3 fueron transfectadas con 1,5μg del plásmido hSox9prom-Luc y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se cultivaron 24h en medio 6H y posteriormente 48 horas en medio 4H. Seguidamente fueron tratadas con TSH y/o TGFβ 24 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. **Panel B:** El ensayo de cambio de movilidad electroforética se realizó con el oligo marcado radiactivamente con P³² conteniendo en su secuencia el elemento de unión a proteínas Smad detectado en el promotor de Sox9. El oligo marcado (Oligo R*) fue incubado en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de Smad3 recombinante (TNT-Smad3). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel C:** Células PCCl3 fueron co-transfectadas con

1,5µg de hSox9prom-Luc y 1,5µg de CMV5-Smad3 y CMV5-Smad4 y 50 ng de pRL-CMV. Las células transfectadas se mantuvieron 24 horas en medio 6H y a continuación 48 horas en medio 4H antes del tratamiento con TSH 24 horas. Las células fueron recogidas para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. **(A y C)** La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p<0,05$ (*), $p=0,01$ a $0,001$ (**): $p<0,001$ (***) .

2.7-. Los factores de transcripción Pax8 y FoxE1 se unen al promotor de Sox9 y regulan su expresión.

En el análisis *in silico* del promotor de Sox9 se identificaron sitios de unión, entre otros, para los factores de transcripción tiroideos Pax8 y FoxE1. Como a lo largo de esta tesis se ha descrito en detalle el importante papel de estos factores de transcripción en el desarrollo, diferenciación y función del tiroides. Fue interesante el estudio de su función en la regulación de la expresión de Sox9.

Para analizar si estos sitios identificados eran capaces de unir a los factores de transcripción tiroideos, en primer lugar se llevaron a cabo ensayos de EMSA con oligonucleótidos que contenían en sus secuencias los sitios de unión detectados *in silico* para Pax8 (-292) y FoxE1 (-1161) en el promotor de Sox9. Cuando se incubaron cada uno de estos oligonucleótidos con proteína recombinante de Pax8 y Sox9 se observó en ambos casos un retardo en la movilidad electroforética de estos oligonucleótidos (Fig-. 30 A y B). Estos resultados confirman que los factores de transcripción tiroideos Pax8 y FoxE1 se unen de forma específica a los sitios consenso detectados en la secuencia del promotor de Sox9. A continuación nos propusimos estudiar si dicha unión era funcional y se traducía en una regulación de la actividad del promotor de Sox9. Para ello se llevaron a cabo ensayos de co-transfección en células Hela de la construcción del promotor de Sox9, promSox9-Luc, junto con los vectores de expresión de Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 en todas las combinaciones posibles (Fig-. 30 C). Se observó que Nkx2-1 no tuvo ningún efecto por sí mismo en la regulación de la actividad transcripcional del promotor de Sox9, mientras que FoxE1 redujo dicha actividad en torno un 25%. Por su parte, solo Pax8 indujo la activación del promotor de Sox9. Además, atendiendo a los resultados de la expresión conjunta de los factores de transcripción, se puede observar que Pax8 coopera de forma positiva con Nkx2-1 y FoxE1 en la regulación de la activación del promotor de Sox9, demostrando que existe una cooperación entre Pax8 y los otros dos factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y FoxE1 en la regulación de la actividad del promotor de Sox9 y por consiguiente en la regulación de su expresión. .

RESULTADOS

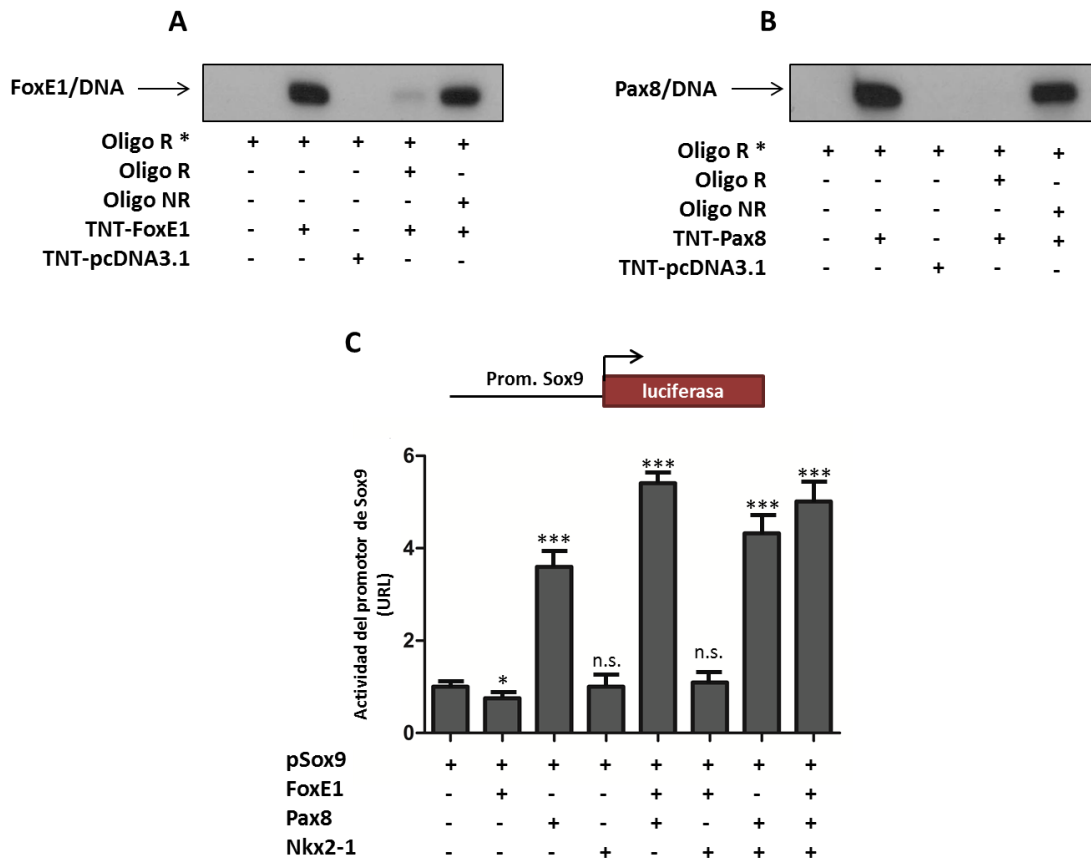


Figura 30-. Función de los factores de transcripción FoxE1, Pax8 y Nkx2-1 en la regulación de la expresión de Sox9. **Paneles A y B:** Los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizaron con los oligonucleótidos marcados radiactivamente con P^{32} conteniendo en su secuencia los sitios de unión de FoxE1 (**A**) y Pax8 (**B**) detectados en el promotor de Sox9. Los oligonucleótidos marcados (Oligo R*) fueron incubados en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de proteína recombinante TNT-FoxE1 (**A**) y TNT-Pax8 (**B**). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con los mismos oligonucleótidos (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel C:** Células Hela fueron co-transfectadas con 1,5µg de hSox9prom-Luc y 1,5µg de CMV-FoxE1, pBS-Nkx2-1 y/o pcDNA3.1-Pax8 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM completo 48 horas y recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**): $p < 0,001$ (***).

Como se ha demostrado en apartados anteriores, Nkx2-1 y Pax8 regulan la expresión de FoxE1 tanto en células foliculares como durante la diferenciación tiroidea. Así mismo, se ha descrito en esta tesis que Pax8 y FoxE1 regulan, de forma positiva y negativa respectivamente, la expresión de Sox9 en células foliculares diferenciadas. Por ello se propuso estudiar la regulación de la expresión de Sox9 mediada por Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 durante el proceso de diferenciación de las células foliculares de tiroides. Para ello se usó como modelo la línea celular de mESCs con expresión inducible por doxiciclina de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8 siguiendo el protocolo de diferenciación a células foliculares de tiroides anteriormente descrito (Antonica et al.

2012). Se analizaron los niveles de mRNA de Pax8, Nkx2-1 y Sox9 a los tres días de tratamiento con Doxiciclina (Fig. 31 A-C), en ausencia (Fig. 31 A) o presencia de TSH o 8-Br-cAMP durante 7 días (Fig. 31 B) o 14 días (Fig. 31 C).

Como se puede observar, la inducción de la expresión en células mESCs indiferenciadas de los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1 y Pax8, y por consiguiente de FoxE1 como se ha demostrado anteriormente (Fig. 19), no fue suficiente para la inducción de la expresión de Sox9 (Fig. 31 A). La activación de la expresión de Sox9 se vio favorecida cuando, además de inducirse la expresión de Nkx2-1, Pax8 y FoxE1, se estimularon las células 14 días con TSH o con 8-Br-cAMP para activar la vía del cAMP/PKA/CREB. Esta activación de la expresión de Sox9 se observó tanto a niveles de mRNA (Fig. 31 C) como de proteína mediante la realización de inmunofluorescencias para la detección de Sox9 (Fig. 31 D).

Estos resultados nos confirman que la expresión de Sox9 está regulada por FoxE1 y Pax8 tanto en células foliculares de tiroides como en células no diferenciadas. El hecho de que FoxE1 inhiba la actividad del promotor de Sox9 y probablemente su expresión durante la diferenciación tiroidea, otorga a Pax8 un papel fundamental en la activación de la expresión de Sox9. Estas evidencias, unidas a los resultados que demuestran la regulación de Sox9 por TSH y TGF β , son de gran interés debido a que sitúan a Sox9 como un posible candidato a participar en la red transcripcional que regula y controla el desarrollo, diferenciación y función de la célula folicular tiroidea.

RESULTADOS

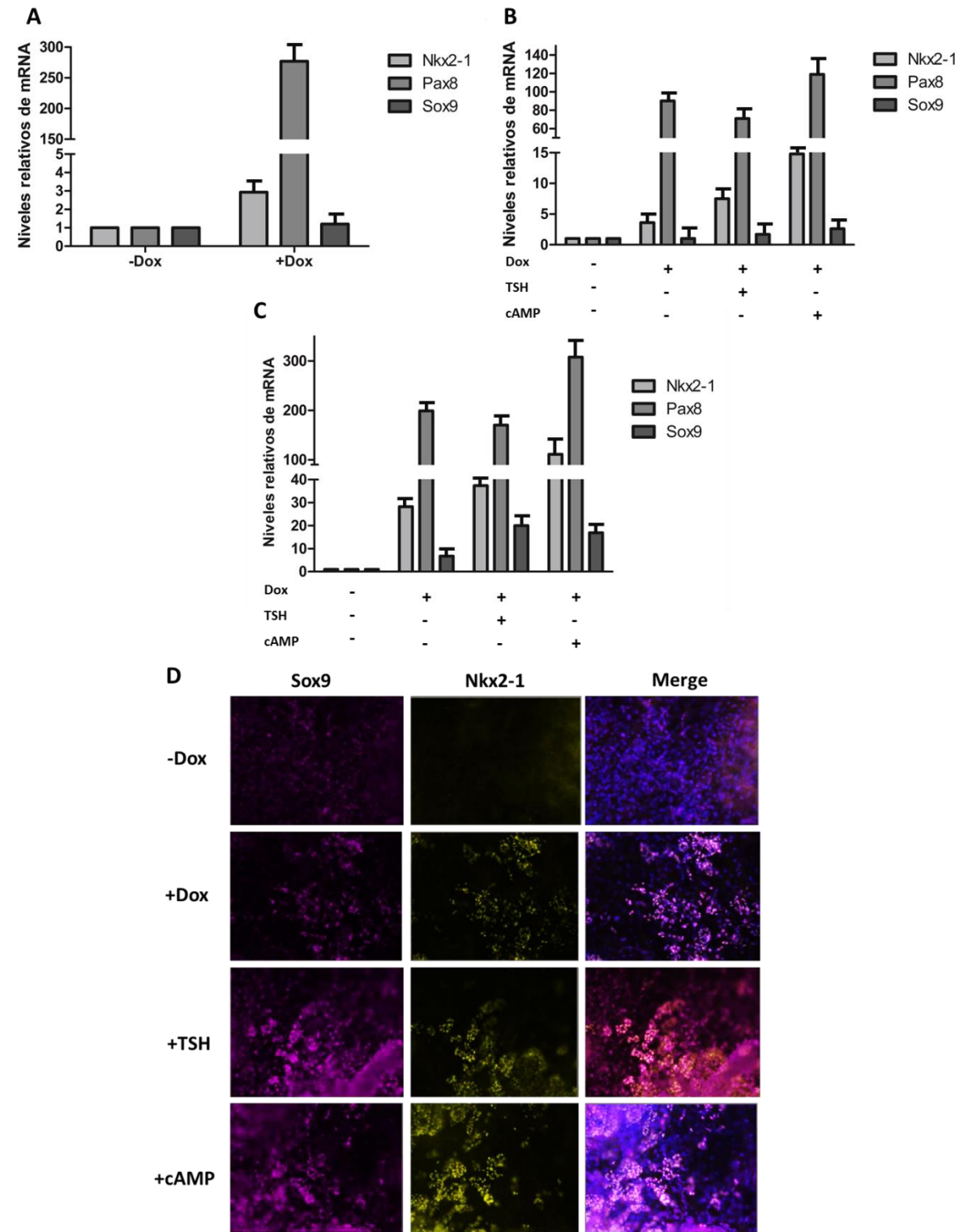


Figura 31-. Inducción de la expresión de Sox9 en mESCs. Las células mESCs con expresión inducible de Nkx2-1 y Pax8 se cultivaron en placas de cultivo (A-C) o cubreobjetos (D) en medio de mantenimiento previamente a la generación de los cuerpos embrioides. Tras 4 días, los cuerpos embrioides se recogieron y se cultivaron en medio de diferenciación con o sin Doxiciclina durante 3 días(A). A continuación las células se mantuvieron en medio de diferenciación con TSH o 8'-Br-cAMP durante 7 (B) y 14 días (C y D). **Paneles A-C:** El RNA fue extraído y retro-transcrito para la posterior detección mediante qPCR de los niveles del mRNA de Sox9, Pax8 y Nkx2-1 relativos a la expresión de la β -actina. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Se determinó la expresión de Sox9 y Nkx2-1 mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de Sox9 y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

2.8-. Sox9 se une a su promotor y reprime su activación

Debido a que en el análisis *in silico* del promotor de Sox9 se identificó un sitio de unión para el propio Sox9 (Fig-. 24) fue interesante estudiar el posible mecanismo de autoregulación de la expresión de Sox9. Para ello, en primer lugar, se realizó un ensayo de EMSA con un oligonucleótido que contenía el sitio de unión para Sox9 identificado en su promotor. La incubación de este oligonucleótido junto con proteína de Sox9 recombinante (TNT-Sox9) dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética del oligonucleótido (Fig-. 32 A). Esta evidencia nos permite concluir que Sox9 se está uniendo físicamente a su sitio de unión identificado en su promotor, sugiriendo una posible autoregulación de su expresión. En este sentido se quiso demostrar si la unión de Sox9 a su promotor era efectiva y tenía alguna consecuencia sobre la actividad de dicho promotor. Para ello se llevaron a cabo ensayos de contranfección en células Hela de la construcción promSox9-Luc junto con un vector de expresión de Sox9. Tras 24 horas se recolectaron las células y se observó que la sobreexpresión de Sox9 tenía como consecuencia una disminución en la actividad transcripcional de su propio promotor (Fig-. 32 B).

Estos datos demuestran que Sox9 se une a su propio promotor inhibiendo, al menos en parte, su actividad. Esta reducción de la actividad del promotor de Sox9 provocada por sí mismo sugiere un posible mecanismo de autorregulación negativa de su expresión.

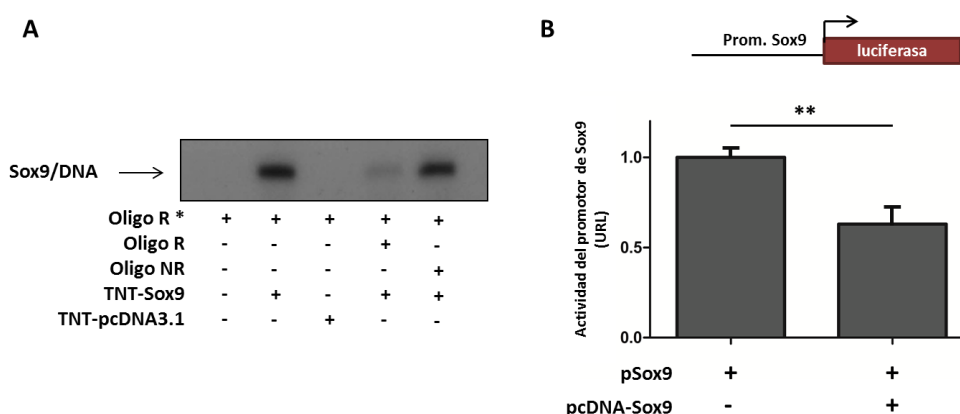


Figura 32-. Función de Sox9 en la regulación de su propia expresión. **Panel A:** El ensayo de cambio de movilidad electroforética se realizó con el oligonucleótido marcado radiactivamente con P^{32} conteniendo en su secuencia el sitio de unión de Sox9 detectado en su promotor. El oligo marcado (Oligo R*) fue incubado en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de Sox9 recombinante (TNT-Sox9). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel B:** Células Hela fueron co-transfectadas con 1,5µg de hSox9prom-Luc y 1,5µg de pcDNA-Sox9 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM completo 48 horas y recogidas para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**): $p < 0,001$ (***)).

2.9-. Sox9 regula positivamente la expresión de FoxE1 a través de la unión a su promotor

Los resultados presentados en esta tesis sobre la regulación de la expresión de Sox9 en las células foliculares de tiroides, así como durante el proceso de diferenciación, apuntan a que este factor de transcripción está finamente regulado en el tiroides. Esto sugiere que Sox9 pudiera estar formando parte de la red transcripcional mediante la cual se regula la expresión de los genes involucrados en los diferentes procesos de diferenciación y función del tiroides.

En primer lugar se marcó el objetivo de estudiar la función de Sox9 en la regulación del factor de transcripción tiroideo FoxE1. Mediante el análisis bioinformático del promotor de FoxE1 se identificó en su secuencia un sitio de unión para Sox9 en la posición -2280 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Para confirmar que ese sitio de unión era activo se realizó un ensayo de EMSA con un oligonucleótido que contenía el sitio de unión para Sox9 identificado en el promotor de FoxE1. La incubación de este oligonucleótido junto con proteína de Sox9 recombinante (TNT-Sox9) dio lugar a un retardo en la movilidad electroforética del oligonucleótido (Fig-. 33 A). Esta evidencia nos permite concluir que Sox9 se está uniendo físicamente a su sitio de unión identificado en el promotor de FoxE1, sugiriendo un posible papel en la regulación de la actividad del promotor de FoxE1. Para confirmar este aspecto se realizaron co-transfecciones en células Hela de la construcción pFoxE1-3.1-Luc junto con un vector de expresión de Sox9. Tras 24 horas, las células se recogieron y se analizó la actividad luciferasa. Se pudo observar que la sobreexpresión de Sox9 indujo 3 veces la actividad transcripcional del promotor de FoxE1 (Fig-. 33 B). Esto confirma que el sitio de unión de Sox9 era funcional y que la unión efectiva de Sox9 a dicho sitio da lugar a una activación del promotor de FoxE1.

Para verificar si Sox9 estaba efectivamente implicado de forma directa en la expresión de FoxE1, se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento de su expresión en células PCCI3 mediante el uso de un siRNA específico para Sox9. Los niveles de mRNA de FoxE1 se vieron reducidos en células sin expresión de Sox9. Esta reducción de los niveles de mRNA de FoxE1 fue mucho más significativa en aquellas células que se habían recogido 16 horas tras el silenciamiento de Sox9 (Fig-. 33 C). En este sentido, cuando se analizaron los niveles de proteína la máxima expresión de silenciamiento de Sox9 se observó a las 48 horas coincidiendo con una reducción drástica de los niveles de FoxE1 (Fig-. 33 D). Estos resultados en su conjunto demuestran que Sox9 regula de forma positiva la expresión de FoxE1 en células foliculares de tiroides a través de la activación de su promotor. Además, en base a estos resultados, se puede proponer que Sox9 juega un papel en el control de la diferenciación tiroidea a través de la regulación de la expresión génica de los

factores de transcripción tiroideos, como FoxE1, y por consiguiente de otros genes de diferenciación tiroideos controlados por FoxE1 como NIS, TPO o Tg.

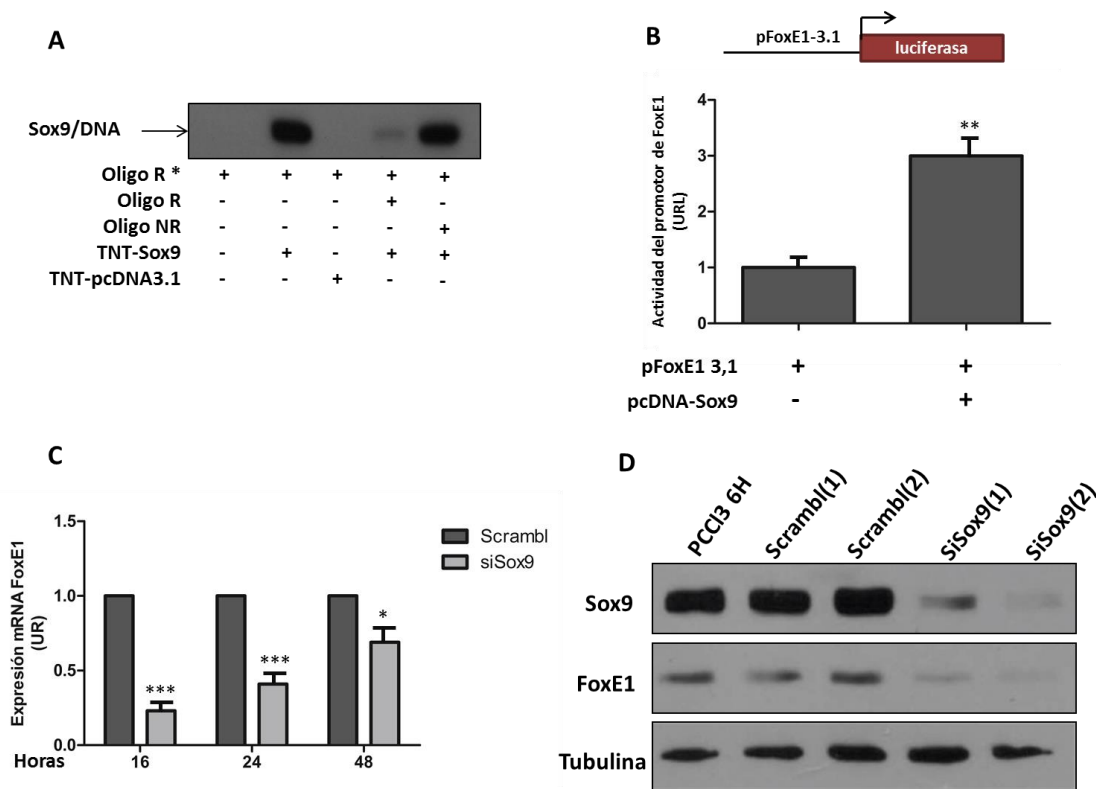


Figura 33-. Función de Sox9 en la regulación de la expresión de FoxE1. **Panel A:** El ensayo de cambio de movilidad electroforética se realizó con el oligonucleótido marcado radiativamente con P^{32} conteniendo en su secuencia el sitio de unión de Sox9 detectado en el promotor de FoxE1. El oligonucleótido marcado (Oligo R*) fue incubado en ausencia (TNT-pcDNA3.1) o presencia de Sox9 recombinante (TNT-Sox9). Para evaluar la especificidad se realizaron competiciones con el mismo oligonucleótido (Oligo R) o con otros oligonucleótidos no relacionados (Oligo NR), que fueron añadidos en exceso con respecto al oligonucleótido marcado. **Panel B:** Células Hela fueron co-transfectadas con 1,5µg de pFoxE1-3.1 y 1,5µg de pcDNA-Sox9 y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células se mantuvieron en medio DMEM completo 48 horas y recogidas para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. **Panel C y D:** La expresión de Sox9 fue inhibida en células PCC13 mediante la transfección con un vector de expresión de un siRNA específico (siSox9). Células PCC13 transfectadas con los vectores siSox9 y siScramble fueron cultivadas en medio 6H y fueron recolectadas a las 16, 24 y 48 horas para la detección de los niveles de mRNA de FoxE1 (**C**) o a las 48 horas para la detección de los niveles de proteína de FoxE1 (**D**). Se analizó la expresión de Sox9 como control del funcionamiento del siRNA y de α -tubulina como control de carga. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**): $p < 0,001$ (***).

DISCUSIÓN



Función y regulación de la expresión de FoxE1 en la célula folicular tiroidea

La TSH controla la expresión de TPO, Tg y NIS mediante la regulación de la expresión FoxE1 a través de la vía cAMP/PKA/CREB

La señalización mediada por la TSH es fundamental para la regulación de la diferenciación y de la proliferación de la célula folicular tiroidea. En este sentido, es bien conocido que la expresión de los genes de diferenciación tiroideos, como Tg, TPO y NIS, está fuertemente regulada por la TSH vía cAMP. Sin embargo, no se han descritos sitios CRE consenso en los promotores de estos genes, con la excepción de un sitio CRE en un enhancer del gen de Tg humano (Berg et al. 1996) y de un sitio CRE-like en el NUE de NIS (Ohno et al. 1999). Trabajos previos de nuestro laboratorio habían descrito la presencia de sitios consenso para FoxE1 en los promotores de Tg y TPO (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993), proponiendo a este factor de transcripción como un mediador de la respuesta hormonal, ya que los niveles de RNA mensajero de FoxE1 aumentan en respuesta a la TSH, y el IGF1 coopera positivamente en este aumento (Ortiz et al. 1997). Sin embargo, se desconocía hasta la fecha el mecanismo por el que la TSH aumenta la expresión de este factor de transcripción así como si ese aumento en los niveles de mRNA se traduce en un aumento de los niveles proteicos de FoxE1.

En base a estos antecedentes, en este trabajo se ha profundizado en la regulación de la expresión del factor de transcripción FoxE1 por la TSH, hormona fundamental en la fisiología tiroidea. Por ello en primer lugar nos propusimos estudiar si en el promotor de FoxE1 existían sitios CRE. La identificación de estos sitios en la secuencia del promotor de FoxE1 nos ha permitido investigar si la TSH estaba mediando su efecto inductor sobre la expresión de FoxE1 a nivel transcripcional mediante la regulación de la actividad de su promotor. El factor de transcripción CREB, un efector final de la vía del cAMP, se unió de manera efectiva a esos sitios CRE identificados, induciendo la actividad del promotor de FoxE1 y demostrando la funcionalidad de los mismos. Esta funcionalidad se vio además reforzada por la unión efectiva del factor de transcripción CREM a dichos sitios y su activación transcripcional sobre el promotor de FoxE1 (Fig.-34). Concretamente, de los dos sitios CRE identificados, hemos observado un papel más relevante del situado en la posición -1627 corriente arriba desde el punto de inicio de la transcripción, ya que se demostró que al usar una construcción del promotor de FoxE1 carente de dicho sitio no se conseguían los mismos niveles de inducción del promotor de FoxE1 en respuesta a la activación de la vía del cAMP. En base a estas evidencias, cabe preguntarse si es CREB o CREM el factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de FoxE1 mediada por TSH. Trabajos previos habían descrito la importancia del factor de transcripción CREB para el normal crecimiento y mantenimiento del

DISCUSIÓN

fenotipo diferenciado de la célula folicular (Woloshin et al. 1992). Además, nuestros resultados en esta tesis mostraron que el silenciamiento específico de CREB dio lugar a una reducción de los niveles de expresión de FoxE1. Para confirmar la unión de CREB a los sitios CRE del promotor de FoxE1 *in vivo* y confirmar también su mayor importancia en comparación con la función de CREM, podrían realizarse en futuras aproximaciones experimentales ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina con un anticuerpo de CREB con extractos nucleares de células tiroideas, así como ensayos de inhibición específica de la expresión de CREM para evaluar su efecto en la expresión de FoxE1. Así mismo, la inhibición específica de la PKA y por consiguiente de la vía de señalización del cAMP, se tradujo en un bloqueo en el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1. Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que la TSH induce la expresión de FoxE1 a través de la vía del cAMP/PKA induciendo la unión de CREB al promotor de FoxE1 (Fig-. 34).

El papel de FoxE1 en la regulación de la expresión de marcadores tiroideos y en el mantenimiento del estado diferenciado de la célula folicular ha sido ampliamente estudiado en nuestro laboratorio. Como se ha descrito anteriormente, FoxE1 está implicado en la expresión de genes de diferenciación tiroideos como son Tg o TPO. Sin embargo, poco se sabía hasta la fecha acerca de su unión y función a los promotores de otros genes de diferenciación tiroideos. El sitio consenso de FoxE1 contiene una única secuencia de 5 nucleótidos (AAACA) que se puede encontrar repetida numerosas veces a lo largo del genoma. Trabajos previos de nuestro laboratorio habían descrito que esa secuencia AAACA de unión de FoxE1 en promotor de TPO se encuentra localizado a 10 pb de un sitio de unión del factor de transcripción constitutivo NF1/CTF y que ambos factores cooperan en la activación transcripcional de TPO (Ortiz et al. 1997). Estos datos corroboraban los ya descritos para el gen de la albúmina en donde el sitio de unión de otro factor de transcripción Forkhead como FoxA2 se encuentra también a 10 pb de un sitio NF1/CTF y que ambos factores cooperan transcripcionalmente (Jackson et al. 1993). Por ello, nos propusimos limitar la búsqueda del sitio consenso de FoxE1 en aquellos promotores en los que dicho sitio estuviera próximo al sitio de unión de NF1/CTF. Nuestros resultados demostraron la existencia de un sitio consenso para FoxE1 en el NUE, la principal región reguladora del promotor de NIS. Además, se identificó un sitio consenso para NF1/CTF muy próximo al sitio consenso para FoxE1, lo cual reforzó la posibilidad de que dicho sitio fuera funcional y necesario para la regulación de la expresión de NIS por FoxE1. Además, el silenciamiento de la expresión de FoxE1 en las células foliculares dio lugar a una reducción de los niveles proteicos de NIS y, además, a una reducción de los niveles de expresión de TPO, lo cual ratifica la implicación de FoxE1 en la regulación de NIS y confirma la implicación de FoxE1 en la regulación de la expresión de TPO descrita previamente en nuestro laboratorio (Aza-Blanc et al. 1993). Se demostró que la regulación de la expresión de NIS por FoxE1

ocurría a nivel transcripcional de forma directa, ya que FoxE1 indujo la actividad transcripcional del promotor de NIS conteniendo la secuencia consenso identificada en el NUE (Fig. 34). Esta inducción de la actividad transcripcional del promotor de NIS fue mucho más evidente cuando FoxE1 se expresó junto con NF1/CTF. La cooperación entre estos dos factores de transcripción se ha propuesto como un mecanismo conservado evolutivamente en el que gracias a la capacidad de las proteínas de la familia Forkhead de remodelar la cromatina compactada (Pierrou et al. 1994), el sitio de unión de NF1/CTF oculto en la estructura del nucleosoma queda desenmascarado, permitiendo que NF1/CTF ejerza su función de transactivación. Nuestros datos refuerzan dicha hipótesis y confirman la cooperación entre estos dos factores de transcripción a la hora de ejercer su papel en la regulación de la expresión génica.

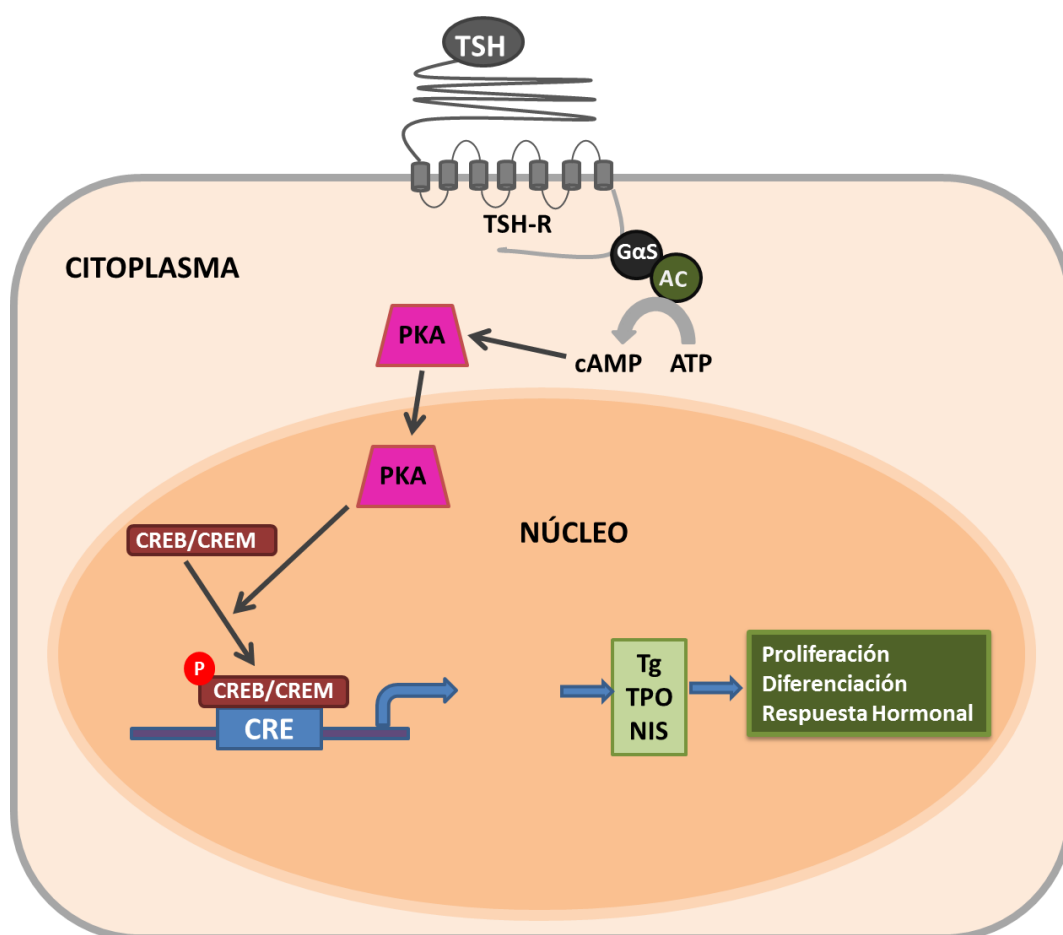


Figura 34.- Esquema de la inducción de la expresión de FoxE1 por TSH vía cAMP y su función como mediador de la respuesta hormonal sobre la expresión de los genes de diferenciación tiroideos. TSH: Hormona estimuladora de tiroides. TSH-R: Receptor de TSH. GαS: Subunidad α de la proteínas G. AC: Adenilato Ciclasa. ATP: Adenosín trifosfato. cAMP: Adenosin monofosfato cíclico. PKA: Proteína quinasa A. CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP. CREM: Modulador del elemento de respuesta a cAMP. CRE: Elemento de respuesta al cAMP. FoxE1: Factor de transcripción Forkhead 1. Tg: Tiroglobulina. TPO: Tiroperoxidasa. NIS: Simportador de Sodio/Iodo. Las flechas indican activación.

DISCUSIÓN

La presencia y funcionalidad de sitios CRE en el promotor de FoxE1 fue interesante a la hora de dilucidar el papel de la TSH en la diferenciación tiroidea, ya que otros genes de diferenciación, fundamentales para el correcto funcionamiento de la célula folicular como es el caso de Tg o TPO, carecen de estas secuencias diana para CREB en sus respectivos promotores. Teniendo en cuenta el importante papel que juega FoxE1 en la regulación de la expresión de estos genes (Santisteban et al. 1992; Aza-Blanc et al. 1993), podría considerarse a FoxE1 como un buen candidato a ejercer un papel de intermediario en la regulación por TSH/cAMP de la expresión de estos marcadores de diferenciación a través de la unión de FoxE1 a sus respectivos promotores (Fig. 34). Nuestros resultados pusieron de manifiesto que TSH también estaba regulando la expresión de NIS a través de la inducción de la expresión de FoxE1 y su unión a su sitio consenso en el NUE, además de la inducción ejercida por la unión de CREB y CREM al sitio CRE-like presente en el NUE que había sido descrita anteriormente (Fenton et al. 2008). Estos resultados en su conjunto otorgan un papel aún más importante que el descrito hasta la fecha a FoxE1 en la mediación de la respuesta hormonal inducida por TSH en la regulación de la expresión de Tg, TPO y NIS, y por consiguiente en la diferenciación de la célula folicular.

El TGFβ inhibe el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1

La citoquina TGFβ juega un papel importante en el control de la proliferación y la diferenciación de las células foliculares de tiroides. El hecho de que la propia célula folicular tiroidea exprese TGFβ, bajo el control de la TSH, permite proponer que existe un mecanismo de regulación autocrino a través del cual el TGFβ controla la proliferación y diferenciación de la célula folicular (Roger 1996; Carneiro et al. 1998). Tal y como se describió en detalle en la introducción de este trabajo, el TGFβ inhibe la diferenciación tiroidea mediante la inhibición de la expresión de genes de diferenciación como Tg, TSH-R o NIS (Pekary and Hershman 1998; Nicolussi et al. 2003). En este sentido, el TGFβ inhibe además la expresión del factor de transcripción Pax8, fundamental para la diferenciación y función de la célula folicular tiroidea, así como su unión a los promotores de Tg y NIS (Kang et al. 2001; Costamagna et al. 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo han indicado que la expresión de FoxE1 en las células foliculares de tiroides está regulada por TGFβ a través de las proteínas Smads, factores de transcripción para los cuales hemos identificado sitios de unión funcionales en el promotor de FoxE1. Se observó que el TGFβ inhibe el efecto inductor de la TSH y el cAMP sobre la expresión de FoxE1 (Fig. 35). Estos resultados son interesantes ya que de la misma manera nuestro laboratorio había descrito que la expresión de NIS inducida por la TSH se inhibe por TGFβ (Costamagna et al. 2004). Nuestros resultados también indicaron que la inhibición por TGFβ del efecto inductor de la

TSH sobre la expresión de FoxE1 tenía lugar también en células pluripotentes en las que se observó un aumento en la expresión de FoxE1 tras la inducción de la expresión de Nkx2-1 y Pax8 (Antonica et al. 2012). Estos datos en células pluripotentes aportan información interesante acerca del posible papel del TGF β en el control de la expresión de marcadores de diferenciación tiroideos durante el desarrollo embrionario, que sería interesante seguir estudiando en el futuro.

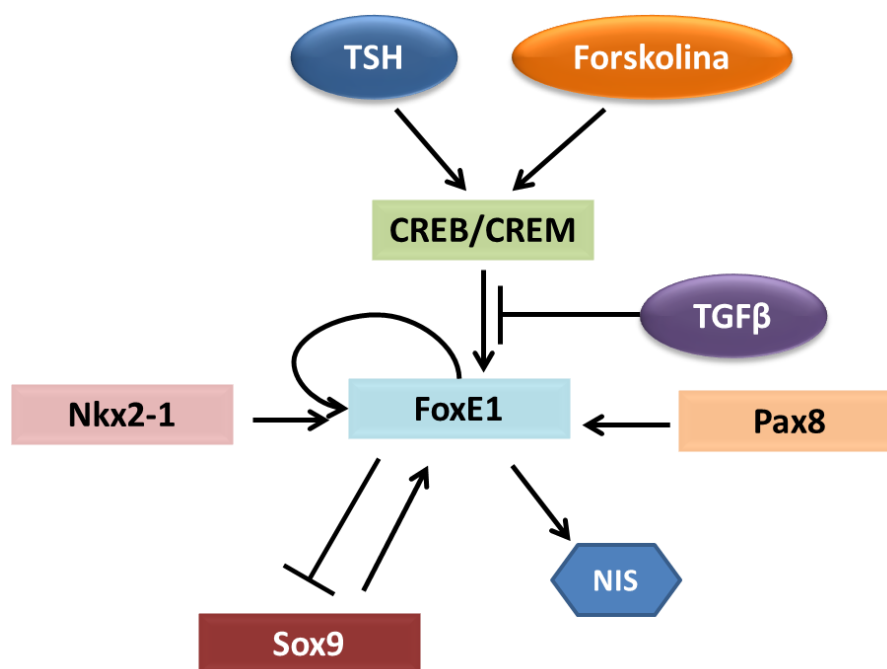


Figura 35-. Representación esquemática de las señales moleculares y los factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de FoxE1, así como sus nuevas dianas transcripcionales en la célula folicular tiroidea. Las flechas indican activación y las líneas truncadas indican inhibición.

El hecho de que el TGF β inhiba la diferenciación tiroidea inducida por TSH, mediante la reducción de la expresión de marcadores tiroideos como FoxE1, NIS o Pax8, evidencia que en la célula folicular tiroidea existe un mecanismo de control de la regulación de la diferenciación, basado en el establecimiento de un balance homeostático entre la señalización inducida por la TSH, principal estimulador de la diferenciación tiroidea, y otras señales como el TGF β , que actúa en el sentido contrario. Este balance regulatorio entre estas dos señales moleculares se ve reforzado por el hecho de que la propia expresión de TGF β está regulada por la TSH, así como porque, tal y como hemos demostrado en este trabajo, Pax8 regula la expresión de FoxE1 y estos dos factores de transcripción tiroideos regulan a su vez la expresión de NIS.

La expresión de FoxE1 está regulada por los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1.

La célula folicular tiroidea es el único tipo celular del organismo que expresa de manera conjunta los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8 y FoxE1. Estos tres factores de transcripción conforman una red transcripcional en la que la expresión de cada uno de ellos es interdependiente de los otros factores y, a su vez, participan de forma conjunta en la regulación de la expresión de los genes de diferenciación tiroideos necesarios para el correcto funcionamiento del tiroides, como NIS, Tg o TPO (Damante et al. 2001). Durante el desarrollo embrionario los tres factores de transcripción comienzan a expresarse simultáneamente en las células endodérmicas precursoras de las células foliculares, determinando su especificación. La expresión de estos factores de transcripción es interdependiente durante las fases tempranas del desarrollo embrionario de tiroides, ya que la ausencia de expresión de uno de ellos se traduce en la reducción de la expresión de los otros, como se ha podido observar en los ratones KO para Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 (Kimura et al. 1996; De Felice et al. 1998; Mansouri et al. 1998).

Los resultados de este trabajo describen la existencia de sitios consenso para Nkx2-1, Pax8 y el propio FoxE1 en el promotor de FoxE1. Esos sitios resultaron ser funcionales, ya que la unión al promotor de FoxE1 de cada uno de los tres factores de transcripción indujo la activación de dicho promotor, que fue mucho más evidente cuando se expresaron los tres factores de transcripción a la vez. Estos resultados evidencian que el mantenimiento de la expresión de FoxE1 en la célula folicular tiroidea diferenciada depende directamente tanto del resto de factores de transcripción como de sí mismo (Fig-. 35). Además, el silenciamiento de Pax8 en células foliculares de tiroides dio lugar a una reducción drástica de los niveles de expresión de FoxE1 (Di Palma et al. 2011). Atendiendo al importante papel de Pax8 en la regulación de la expresión de FoxE1, y teniendo en cuenta que FoxE1 está directamente implicado en la regulación de distintos marcadores de tiroides como TPO, Tg y NIS, estos resultados refuerzan el papel fundamental de Pax8 y FoxE1 en el mantenimiento de estado diferenciado de la célula folicular tiroidea mediante el establecimiento de un circuito regulatorio transcripcional en el que la expresión de cada uno de los factores de transcripción está regulada de forma recíproca por el resto y todos en su conjunto regulan la expresión de los marcadores de diferenciación tiroideos (Pasca di Magliano et al. 2000).

El hecho de que la expresión de FoxE1 en células madre indiferenciadas se indujera tras la activación de la expresión Nkx2-1 y Pax8, siguiendo el protocolo de diferenciación descrito (Antonica et al. 2012), evidenciaron que la expresión de FoxE1 está regulada por Pax8 y Nkx2-1 también en fases previas a la total diferenciación de la célula folicular. Además, esta inducción de

la expresión de FoxE1 observada tras la expresión de Nkx2-1 y Pax8 en células madre indiferenciadas puede ser de gran utilidad a la hora de dilucidar cuales son los mecanismos implicados en la regulación transcripcional de FoxE1 antes y durante la especificación tiroidea en el desarrollo embrionario. Esto es de gran importancia, teniendo en cuenta el papel fundamental que juega FoxE1, por si solo y en cooperación con Nkx2-1 y Pax8, en el correcto desarrollo embrionario de la glándula tiroides.

Expresión y función de Sox9 en el control de la diferenciación de la célula folicular tiroidea.

La especificación tiroidea a partir de los precursores endodérmicos durante el desarrollo embrionario requiere la expresión conjunta de los factores de transcripción Nkx2-1, Pax8, FoxE1 y Hhex a E8.5 en el caso del ratón. Además, esta misma combinación de factores de transcripción determina y mantiene el fenotipo diferenciado de la célula folicular tiroidea (Damante et al. 2001). Sin embargo, se conoce menos acerca de otros factores de transcripción implicados tanto en el desarrollo embrionario como en el mantenimiento del estado diferenciado de la célula folicular en el tiroides adulto. En este sentido, la familia de factores de transcripción Sox juega un papel fundamental en el control de la diferenciación de tejidos y tipos celulares como páncreas, hígado, folículo piloso, testículos o sistema nervioso (Kamachi and Kondoh 2013). Concretamente, en este trabajo, nos hemos centrado en el estudio del factor de transcripción Sox9, ya que juega un papel fundamental en el desarrollo y diferenciación de órganos del mismo origen endodérmico que el tiroides, como el páncreas o el hígado (Kawaguchi 2013).

Sox9 se expresa en el primordio tiroideo y en el mesénquima circundante durante el desarrollo embrionario

En primer lugar se observó que las células precursoras que conforman el primordio tiroideo expresan Sox9 a partir de E9.5, aunque de forma débil y solamente en algunas células aisladas. Sin embargo, la expresión es mucho más evidente a medida que avanza el desarrollo embrionario, pudiéndose detectar en todas las células del primordio tiroideo de forma clara a partir de E11.5. Esto nos indica que Sox9 comenzaba a expresarse en el tiroides en una fase posterior, o al menos concomitante a la especificación tiroidea de los precursores endodérmicos y por consiguiente de forma posterior a la expresión de los factores de transcripción tiroideos. En este sentido, nuestros resultados de los experimentos usando células madre indiferenciadas con expresión inducible de Nkx2-1 y Pax8 apuntan a que la expresión de Sox9 durante la diferenciación de la célula folicular pudiera estar bajo el control de los factores de transcripción tiroideos. En base a estas evidencias

DISCUSIÓN

de puede concluir que Sox9 no juega un papel fundamental en la especificación tiroidea, pero sin embargo, la detección de su expresión en etapas tan tempranas del desarrollo embrionario en el primordio tiroideo apunta a que Sox9 pudiera estar jugando un papel importante en fases posteriores del desarrollo y en la diferenciación de la célula folicular. Fue muy llamativa la elevada expresión de Sox9 en el mesénquima circundante al primordio tiroideo. Esta evidencia puede explicarse por la función de Sox9 en la formación de la tráquea, concretamente de los anillos cartilaginosos que la forman, durante el desarrollo embrionario. Se ha descrito que Sox9 se expresa en el mesénquima indiferenciado derivado del endodermo faríngeo a partir de E9 en el caso del ratón, dónde está implicado en la condensación de las células mesenquimales para dar lugar a las estructuras pre-condrocíticas así como en la maduración y la diferenciación del cartílago que dará lugar a la tráquea (Elluru and Whitsett 2004). Además, se ha descrito que el mesénquima que dará lugar a la tráquea expresa Fgf10, lo que aumenta los niveles de Shh que a su vez está implicado en la regulación de la expresión de Sox9 (Park et al. 2010; Sala et al. 2011). Además, la regulación de la expresión de Sox9 por Fgf se ha descrito en otros órganos como en el caso del páncreas (Seymour et al. 2012) o testículo (Bagheri-Fam et al. 2008), siendo fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la diferenciación de estos tejidos. Así mismo, diversos trabajos han descrito la implicación de las vías de Shh (Fagman et al. 2004) y de Fgf (Wendl et al. 2007; Fagman and Nilsson 2011) en el desarrollo y diferenciación tiroideo, por lo que la expresión de Sox9, así como su función, descrita en el tiroides embrionario pudiera estar controlada por estas señales moleculares secretadas por el mesénquima circundante, siendo uno de los mecanismos a través del cual el mesénquima que rodea al tiroides pudiera estar regulando el desarrollo y diferenciación tiroideos.

Sox9 se expresa en las células foliculares de tiroides bajo la regulación de la TSH y el TGFβ

Nuestros resultados demostraron que la expresión de Sox9, que se había observado en las células precursoras del primordio tiroideo, se mantiene en el tiroides adulto, donde se observó una localización evidente en el núcleo. Dicha expresión es exclusiva de las células foliculares ya que no se vió en las células C o las del tejido conjuntivo. El hecho de que la expresión de Sox9 se observara aún con mayor intensidad en las células foliculares del tiroides adulto que en el tiroides embrionario nos indica que este factor de transcripción pudiera estar jugando un papel en el mantenimiento de la diferenciación de la célula folicular tiroidea. Teniendo en cuenta que, como se ha descrito en este trabajo, la TSH y el TGFβ son dos de las señales moleculares fundamentales para la diferenciación tiroidea, se quiso estudiar la regulación de la expresión de Sox9 por sendas vías de señalización. Se observó que la TSH indujo la expresión de Sox9 a través de la vía del cAMP,

mediante la unión del factor de transcripción CREB al sitio CRE identificado en el promotor de Sox9. Además, el silenciamiento de la expresión de CREB en células foliculares de tiroides de rata dio lugar a una reducción drástica de los niveles de mRNA y de proteína de Sox9, evidenciando la implicación de la vía del cAMP/PKA/CREB en la regulación de la expresión de Sox9 en células foliculares.

Así mismo, al igual que ocurría en el caso de FoxE1 y que hemos descrito anteriormente y en el caso de otros genes como Pax8 o NIS, el TGF β , a través de las Smad, inhibió el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de Sox9. En este sentido se pudo concluir que esta inhibición ocurría a nivel del control de la actividad del promotor de Sox9, ya que la sobreexpresión de las proteínas Smad3 y 4 dio lugar a la inhibición de la actividad del promotor de Sox9 inducida por la TSH (Fig. 36). El hecho de que la expresión de Sox9 esté regulada de forma negativa por el TGF β nos confirma la existencia de un balance homeostático entre las vías del TSH/cAMP y del TGF β que controla la diferenciación de la célula folicular tiroidea. Hay que destacar que la activación o represión de la expresión tejido- y tiempo-específica de Sox9 está finamente regulada mediante cambios de metilación en diferentes *enhancers* o regiones del promotor. Estas regiones van a variar su estado de metilación, y por consiguiente su actividad, dependiendo del tipo celular y del momento. Esta regulación, bien positiva o negativa, de su expresión es necesaria para que Sox9 lleve a cabo de forma correcta las diferentes funciones en los diversos tejidos donde se observa su expresión (Symon and Harley 2017).

Además de las vías de la TSH y el TGF β , trabajos previos de nuestro laboratorio han descrito la importancia de la vía Wnt/ β -catenina en la diferenciación y proliferación de la célula folicular tiroidea (Sastre-Perona and Santisteban 2014). Es interesante destacar que la expresión de Sox9 está regulada por la β -catenina en otros tejidos, como la piel (Li et al. 2016). Así mismo, Sox9 controla la activación de la vía de β -catenina en tejidos como la próstata (Ma et al. 2016). Se ha descrito que Sox9 interacciona físicamente con la β -catenina para regular su actividad transcripcional (Prevostel et al. 2016) y que promueve la localización nuclear y consecuente fosforilación y degradación de la β -catenina regulando la activación de la vía Wnt (Topol et al. 2009). Además, se ha descrito que otros genes de la familia Sox, como Sox13, y de expresión tiroidea, como Hhex, regulan la actividad de la vía Wnt (Marfil et al. 2010). En base a estas evidencias, sería interesante estudiar el papel de la vía de Wnt/ β -catenina en el control de la expresión de Sox9 en la célula folicular tiroidea, así como la función de Sox9 sobre la regulación de la actividad de la vía de β -catenina en relación a su papel en la diferenciación y proliferación de la célula folicular tiroidea. Además, numerosos trabajos han descrito que Sox9 es susceptible de fosforilación en diferentes residuos de Serina de su secuencia aminoacídica (Fig. 11). Se ha

DISCUSIÓN

descrito que dichas fosforilaciones pueden ser dependientes de la vía de BMP y Wnt (Liu et al. 2013) o de la vía de cAMP/PKA (Huang et al. 2000) e inducen la traslocación al núcleo de Sox9 y aumentan su capacidad de unirse al DNA. Teniendo en cuenta la relevancia de la vía de Wnt, y especialmente de la activación de la vía de cAMP/PKA por la TSH, sería interesante estudiar si la TSH, además de inducir la expresión de Sox9, induce su fosforilación y por consiguiente regula su función a través de la modulación de su capacidad de transactivación de sus genes diana.

Nuestros resultados nos indican que Sox9 responde, de la misma manera que otros genes de diferenciación tiroideos, a la regulación de su expresión por TSH y TGF β evidenciando que este factor de transcripción está implicado en la red de regulación hormonal y transcripcional que controla el mantenimiento de la diferenciación tiroidea. El hecho de que la expresión de Sox9 esté regulada por la TSH lo convierte en un nuevo candidato a actuar como mediador transcripcional de la señalización hormonal inducida por la TSH en la célula folicular tiroidea, como se ha demostrado para el caso de FoxE1, en aquellos genes regulados por la TSH pero que carecen de sitios CRE en sus regionales reguladoras de la transcripción y en sus promotores.

Los factores de transcripción tiroideos FoxE1 y Pax8 regulan la expresión de Sox9

La expresión de Sox9 en la célula folicular tiroidea, así como las diferentes evidencias que demuestran que dicha expresión está regulada a nivel transcripcional por las vías de señalización activadas por la TSH y el TGF β , indican que Sox9 forma parte del conjunto de factores que se expresan y participan en la red transcripcional que controla la diferenciación de la célula folicular tiroidea. Como se ha demostrado con anterioridad la expresión de los factores de transcripción tiroideos está controlada de forma conjunta por el resto de factores, formando una red de regulación transcripcional que controla la expresión de dichos factores así como de los genes específicos de tiroides necesarios para la síntesis de las hormonas tiroideas. En este contexto, nuestros resultados evidenciaron la existencia de sitios de respuesta para los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1 en el promotor de Sox9. El hecho de que la sobreexpresión de Nkx2-1 no tuviera ningún efecto sobre la regulación de la actividad del promotor de Sox9 nos hizo centrarnos en mayor medida en los posibles efectos de Pax8 y FoxE1.

Tal y como se pudo observar, Pax8 y FoxE1 se unen de forma efectiva a sus sitios consenso en el promotor de Sox9. Nuestros resultados demostraron que FoxE1 ejercía una función represora de la actividad del promotor de Sox9. La capacidad de represión transcripcional de FoxE1 había sido anteriormente descrita durante el desarrollo embrionario. En este sentido diversos trabajos describen que FoxE1 a través de su región C-terminal, que contiene un dominio rico en Alaninas, inhibe la actividad transcripcional de Pax8 y Nkx2-1 (Perrone et al. 2000). Además, también se ha

descrito que FoxE1, a través de este mismo dominio, inhibe la transactivación de receptor de estrógenos α (Park et al. 2012). Además, otros trabajos han descrito que otro factor de transcripción de la familia Forkhead, FoxL2, inhibe la expresión de Sox9 en ovario mediante la unión, de forma sinérgica con el receptor de estrógeno, a un enhancer presente en la secuencia reguladora de Sox9. En ausencia de FoxL2, la expresión de Sox9 aumenta, dando lugar a una transdiferenciación a células de Sertoli (Uhlenhaut et al. 2009). Sería interesante estudiar en el futuro los mecanismos a través de los cuales FoxE1 inhibe la actividad de promotor de Sox9 y si esta función represora de FoxE1 se traduce en una reducción de la expresión a nivel de mRNA y proteína de Sox9. En cuanto a la función de Pax8 sobre la expresión de Sox9 se observó que la sobreexpresión de este factor de forma conjunta tanto con Nkx2-1 como con FoxE1, se tradujo en la activación del promotor de Sox9 de forma mucho más evidente. Esto nos indica que Pax8 induce la actividad del promotor de Sox9 y para ello coopera con los otros dos factores de transcripción tiroideos. Es especialmente interesante la cooperación observada de Nkx2-1 con Pax8, ya que nuestros resultados demostraron que Nkx2-1 por sí solo no indujo ningún cambio en la actividad transcripcional del promotor de Sox9. Esta cooperación funcional entre Nkx2-1 y Pax8 había sido descrita anteriormente para otros genes de diferenciación tiroidea como Tg para lo que eran necesarios sus regiones N y C-terminal respectivamente (Di Palma et al. 2003). En base a que los sitios consenso para Nkx2-1 y Pax8 identificados en este trabajo en el promotor proximal de Sox9 están situados tan solo a unas 30 pares de bases de distancia, sería interesante estudiar en el futuro si la cooperación observada de Pax8 y Nkx2-1 en la regulación de la expresión de Sox9 se debe a una interacción física entre estos dos factores de transcripción. Además, diversos trabajos han descrito la capacidad de Nkx2-1 de interactuar con múltiples factores de transcripción, entre otros AP1 (Sever-Chroneos et al. 1999), CBP/p300 (Yi et al. 2002) o TAZ (Di Palma et al. 2009), para regular la expresión de diferentes genes, como el de la proteína surfactante de pulmón en este tejido. En este contexto, Pax8, tras su unión al promotor de Sox9, podría estar reclutando otros factores de transcripción o co-factores como Nkx2-1 para regular la expresión de Sox9 de forma tejida específica.

Esta interacción física y funcional de Pax8 y Nkx2-1 se ha propuesto como uno de los mecanismos por los que se controla la expresión génica de los marcadores de diferenciación tiroideos, por lo que en base a nuestros resultados y a las evidencias disponibles hasta ahora cabría esperar que Pax8 y Nkx2-1 regularan la expresión de Sox9 en la célula folicular tiroidea de forma cooperativa. Además, el claro papel de Pax8 en la regulación de Sox9, y teniendo en cuenta el papel fundamental de este factor de transcripción en la diferenciación tiroidea (Pasca di Magliano et al.

DISCUSIÓN

2000), confirman la implicación de Sox9 en la red de regulación transcripcional de la célula folicular tiroidea (Fig-. 36).

Sox9 está implicado en la regulación de su propia expresión y en la de FoxE1

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que Sox9 se expresa en la célula folicular tiroidea y está finamente regulado por las vías de señalización activadas por la TSH y el TGF β , así como por los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y FoxE1. Estos datos evidencian que Sox9 forma parte del conjunto de proteínas implicadas en el control de la expresión de los genes involucrados en la diferenciación tiroidea. Por ello, en este trabajo nos propusimos estudiar el potencial papel de Sox9 en la regulación de la expresión de otros genes implicados en la diferenciación de la célula folicular tiroidea. Diversos trabajos han descrito el importante papel de Sox9 en la regulación de la expresión de genes implicados en la diferenciación de otros tejidos como el hueso o el páncreas (Oh et al. 2014; Shih et al. 2015).

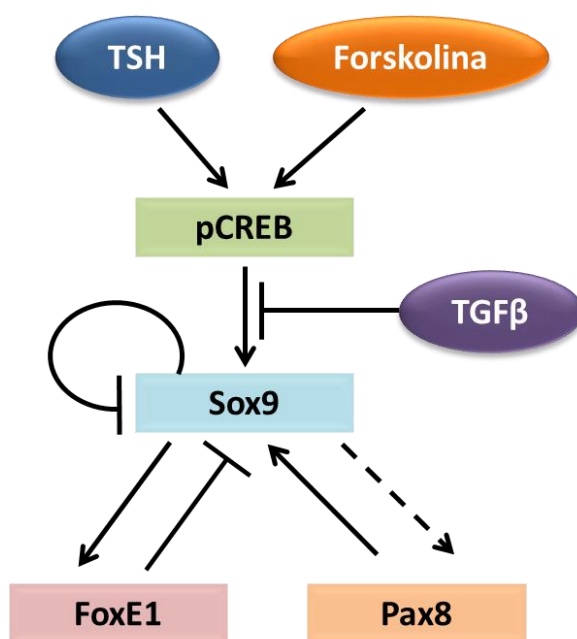


Figura 36-. Representación esquemática de las señales moleculares y los factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de Sox9 en la célula folicular tiroidea. Las flechas indican activación, las líneas truncadas indican inhibición y las flechas punteadas indican una potencial regulación.

En primer lugar observamos que Sox9 se une al sitio consenso detectado en su mismo promotor, inhibiendo su activación (Fig-. 36). Estos resultados demuestran que Sox9 se regula a si mismo mediante un mecanismo de autoregulación negativo. Este mecanismo podría ser fundamental para el control de su propia actividad y su función y ha sido descrito para otros miembros de la familia de factores de transcripción Sox, como Sox15 (Dichtel-Danjoy et al. 2009). Sin embargo,

sería interesante seguir profundizando en los mecanismos implicados en la autorregulación de la expresión de Sox9 en células foliculares de tiroides, ya que diversos trabajos han descrito que en ciertos tipos celulares Sox9 regula positivamente su propia expresión. En el caso del páncreas, intestino o el hígado se ha identificado un enhancer a aproximadamente 70Kb del punto de inicio de la transcripción conocido como SOM (Activador de Sox9 en tejidos somáticos) al cual Sox9 se une induciendo la activación de su expresión (Mead et al. 2013). Así mismo, la expresión de Sox9 en los testículos embrionarios está autorregulada de forma positiva a través de la unión de Sox9 a un enhancer conocido como TES (Enhancer de Sox9 en testículo). A dicha secuencia se une el factor de transcripción determinante de la sexualidad masculina SRY junto con SF1. A continuación, cuando se ha iniciado la expresión de Sox9, es este el que se une a dicha secuencia manteniendo la activación de su expresión (Sekido and Lovell-Badge 2008; Gonen et al. 2017). La mutación tanto de SOM como de TES reduce en torno a un 40% la expresión de Sox9 en los respectivos tipos celulares. Esto nos indica que aunque estos enhancers regulen de forma positiva la expresión de Sox9, no son las únicas regionales reguladoras, ya que no se observa una reducción total de la expresión de Sox9. Por ello, la secuencia en el promotor proximal que hemos identificado en esta tesis, y que inhibe la activación del promotor de Sox9 tras su unión, pudiera estar ejerciendo el papel contrario a los enhancer, estableciéndose un balance entre las regionales lejanas y proximales del promotor de Sox9 que controle su expresión.

Posteriormente, y en base a que en este trabajo nos habíamos centrado en FoxE1 y teniendo en cuenta el papel de este factor de transcripción como mediador de la señalización hormonal y como regulador transcripcional de la diferenciación de la célula folicular tiroidea, se estudió el papel de Sox9 en la regulación de la expresión de FoxE1. Nuestros resultados mostraron que Sox9 se une al promotor de FoxE1, y que dicha unión se traduce en la activación de dicho promotor. Además, el silenciamiento de la expresión de Sox9 dio lugar a una reducción drástica en los niveles de expresión de FoxE1 (Fig-. 36). Estos resultados ponen de manifiesto que Sox9 está regulando la expresión de FoxE1 en la célula folicular tiroidea. Además, resultados preliminares no mostrados en este trabajo indican que Sox9 está implicado en la regulación de la expresión de Pax8 mediante la inducción de la actividad de su promotor. Teniendo en cuenta el importante papel de FoxE1 y Pax8 descrito en este trabajo en la regulación de la expresión de genes tiroideos, se puede concluir que Sox9 está involucrado en la regulación de dicha diferenciación de la célula folicular tiroidea.

Diversos trabajos han descrito la capacidad de Sox9 de formar complejos transcripcionales en forma de homo o heterodímeros consigo mismo o con otros miembros de la familia Sox. La formación de estos complejos regula la función de Sox9 a la hora de activar o reprimir la expresión de sus dianas transcripcionales y modifica también su capacidad de unión a las secuencias de DNA

DISCUSIÓN

consenso en los promotores de los genes diana (Kamachi et al. 2000; Bernard et al. 2003). Además, se ha descrito que Sox9 puede interaccionar formando complejos transcripcionales con otros factores de transcripción como Gli (Leung et al. 2011) o CREB (Zhao et al. 2009) para regular la expresión de diferentes genes. En base a estas evidencias, se ha propuesto que la activación o la represión de las dianas génicas de Sox9 depende no solo del sitio consenso en los respectivos promotores, sino de las proteínas con las que dimerice Sox9, así como de los corepresores y cofactores a los que se una. Será interesante estudiar en futuras aproximaciones experimentales si la homodimerización de Sox9 y su heterodimerización con otros factores Sox o con otras proteínas como CREB, ejerce algún papel en la función de Sox9 en la regulación que hemos observado de la expresión de FoxE1, y potencialmente, de otros genes de diferenciación tiroideos.

Este trabajo en su conjunto aporta datos relevantes sobre la regulación recíproca de la expresión de FoxE1 y Sox9 así como acerca de sus respectivas funciones y su posición en la compleja red transcripcional que regula el control de la expresión génica de la diferenciación de la célula folicular tiroidea. En este sentido, será interesante seguir profundizando en futuras aproximaciones experimentales en el papel de Sox9 en la regulación de la expresión de otros marcadores de tiroides, como TPO, Tg o NIS, así como en su posible papel como mediador transcripcional de la señalización hormonal inducida por la TSH en la célula folicular tiroidea, como se ha demostrado para el caso de FoxE1. Además, será de gran interés en el futuro estudiar la función de otras vías de señalización implicadas en fases iniciales del desarrollo tiroideo, como Shh o Fgf, en la regulación de la expresión de Sox9, para dilucidar el posible papel de este factor de transcripción en la especificación tiroidea.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La TSH regula la expresión de FoxE1 a través de la activación de la vía de cAMP/PKA dando lugar a la unión tanto de CREB como de CREM a los sitios CRE identificados en el promotor de FoxE1 e induciendo su activación.
- 2) El silenciamiento de CREB en la célula folicular tiroidea reduce los niveles de expresión de FoxE1, lo que significa que este factor de transcripción es el principal mediador de la respuesta a TSH/cAMP/PKA
- 3) El TGF β , a través de las proteínas Smads, inhibe el efecto inductor de la TSH sobre la expresión de FoxE1 estableciéndose un mecanismo de balance homeostático entre las dos vías de señalización que controla la expresión de FoxE1 en la célula folicular tiroidea.
- 4) Los factores de transcripción tiroideos Nkx2-1, Pax8 y el propio FoxE1 se unen al promotor de FoxE1 e inducen su activación y su expresión, tanto en células foliculares diferenciadas como en células pluripotentes indiferenciadas. El importante papel de Pax8 sobre la regulación de FoxE1 se confirma por el hecho de que el silenciamiento de Pax8 se traduce en una disminución de los niveles de expresión de FoxE1.
- 5) El factor de transcripción FoxE1, mediante la cooperación con NF1/CTF, induce la expresión de NIS a través de su unión a su sitio consenso identificado en el *enhancer* de NIS (NUE), confirmando el papel de FoxE1 como mediador de la respuesta hormonal inducida por TSH sobre la regulación de los genes de diferenciación tiroideos.
- 6) El factor de transcripción Sox9 se expresa en el tiroides embrionario y el mesénquima circundante, así como en las células foliculares del tiroides adulto.
- 7) La TSH, a través de la vía del cAMP/PKA/CREB, induce la expresión de Sox9 mediante la unión de CREB al sitio CRE descrito en su promotor induciendo su activación. Además, el silenciamiento de CREB en la célula folicular da lugar a una reducción en los niveles de expresión de Sox9.
- 8) El TGF β inhibe a través de las proteínas Smads la inducción de la expresión de Sox9 promovida por la TSH, confirmando el papel de esta vía de señalización como regulador negativo de la diferenciación de la célula folicular tiroidea.
- 9) Los factores de transcripción tiroideos Pax8 y FoxE1 se unen a sus secuencias consenso identificadas en el promotor de Sox9, induciendo e inhibiendo respectivamente su transcripción.
- 10) Sox9 se une a sus secuencias consensos identificadas en el promotor de FoxE1 y en el suyo propio induciendo su activación y su represión respectivamente. El silenciamiento de Sox9 da lugar a una reducción en los niveles de expresión de FoxE1, lo cual confirma la implicación de Sox9 en la compleja red transcripcional que controla la diferenciación de la célula folicular tiroidea.

BIBLIOGRAFÍA



- Ahfeldt T, Schinzel RT, Lee YK, Hendrickson D, Kaplan A, Lum DH, Camahort R, Xia F, Shay J, Rhee EP et al. 2012. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol* **14**: 209-219.
- Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, Refetoff S, Peremans K, Manto M, Kyba M et al. 2012. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* **491**: 66-71.
- Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, Stanger BZ, Jacquemin P, Pierreux CE, Clotman F, Lemaigre FP. 2009. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* **136**: 2325-2333.
- Ariga M, Nedachi T, Akahori M, Sakamoto H, Ito Y, Hakuno F, Takahashi S. 2000. Signalling pathways of insulin-like growth factor-I that are augmented by cAMP in FRTL-5 cells. *Biochem J* **348 Pt 2**: 409-416.
- Aza-Blanc P, Di Lauro R, Santisteban P. 1993. Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol Endocrinol* **7**: 1297-1306.
- Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Jayakody I, Taketo MM, Scherer G, Harley VR. 2008. Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev Biol* **314**: 71-83.
- Berg V, Vassart G, Christophe D. 1996. Identification of a thyroid-specific and cAMP-responsive enhancer in the upstream sequences of the human thyroglobulin promoter. *Biochim Biophys Acta* **1307**: 35-38.
- Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley VR, Vilain E. 2003. Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* **12**: 1755-1765.
- Bogue CW, Ganea GR, Sturm E, Ianucci R, Jacobs HC. 2000. Hex expression suggests a role in the development and function of organs derived from foregut endoderm. *Dev Dyn* **219**: 84-89.
- Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyba M, Blanpain C. 2008. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* **3**: 69-84.
- Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M. 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of Drosophila. *Cell* **47**: 1033-1040.
- Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP, Zaret KS. 2006. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* **290**: 44-56.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brewer C, Yeager N, Di Cristofano A. 2007. Thyroid-stimulating hormone initiated proliferative signals converge in vivo on the mTOR kinase without activating AKT. *Cancer Res* **67**: 8002-8006.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ. 2009. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7**: e1000172.
- Cao X, Kambe F, Ohmori S, Seo H. 2002. Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired domain by Ref-1 regulates DNA-binding activity of Pax-8. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 288-293.

- Carneiro C, Alvarez CV, Zalvide J, Vidal A, Dominguez F. 1998. TGF-beta1 actions on FRTL-5 cells provide a model for the physiological regulation of thyroid growth. *Oncogene* **16**: 1455-1465.
- Cass LA, Meinkoth JL. 2000. Ras signaling through PI3K confers hormone-independent proliferation that is compatible with differentiation. *Oncogene* **19**: 924-932.
- Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL. 1999. Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol* **19**: 5882-5891.
- Cirafici AM, Pepe S, Mincione G, Esposito D, Colletta G. 1992. TGF beta inhibits rat thyroid cell proliferation without alterations in the expression of TSH-induced cell cycle-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 225-233.
- Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R. 1989. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* **8**: 2537-2542.
- Clement S, Refetoff S, Robaye B, Dumont JE, Schurmans S. 2001. Low TSH requirement and goiter in transgenic mice overexpressing IGF-I and IGF-Ir receptor in the thyroid gland. *Endocrinology* **142**: 5131-5139.
- Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK. 1998. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* **19**: 399-401.
- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* **122**: 509-520.
- Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. 2001. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**: L823-838.
- Costamagna E, Garcia B, Santisteban P. 2004. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem* **279**: 3439-3446.
- Crompton MR, Bartlett TJ, MacGregor AD, Manfioletti G, Buratti E, Giancotti V, Goodwin GH. 1992. Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 5661-5667.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785-789.
- Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. 2007. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol* **27**: 7302-7314.
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **68**: 965-1014.
- Chen CA, Okayama H. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**: 632-638.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855-859.
- D'Elia AV, Tell G, Russo D, Arturi F, Puglisi F, Manfioletti G, Gattei V, Mack DL, Cataldi P, Filetti S et al. 2002. Expression and localization of the homeodomain-containing protein HEX in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 1376-1383.
- Dai G, Levy O, Carrasco N. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* **379**: 458-460.
- Damante G, Di Lauro R. 1994. Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1218**: 255-266.
- Damante G, Tell G, Di Lauro R. 2001. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**: 307-356.

- Dame K, Cincotta S, Lang AH, Sanghrajka RM, Zhang L, Choi J, Kwok L, Wilson T, Kandula MM, Monti S et al. 2017. Thyroid Progenitors Are Robustly Derived from Embryonic Stem Cells through Transient, Developmental Stage-Specific Overexpression of Nkx2-1. *Stem Cell Reports*.
- Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R. 2002. Distribution of the *titf2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev Dyn* **224**: 450-456.
- De Deken X, Wang D, Dumont JE, Miot F. 2002. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H(2)O(2)-generating system. *Exp Cell Res* **273**: 187-196.
- De Felice M, Di Lauro R. 2004. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* **25**: 722-746.
- De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H et al. 1998. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* **19**: 395-398.
- Degroot LJ, Niepomniszcze H. 1977. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism* **26**: 665-718.
- Delmarcelle AS, Villacorte M, Hick AC, Pierreux CE. 2014. An ex vivo culture system to study thyroid development. *J Vis Exp*.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**: 701-705.
- Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S. 2010. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest* **120**: 3377-3388.
- Di Palma T, Conti A, de Cristofaro T, Scala S, Nitsch L, Zannini M. 2011. Identification of novel Pax8 targets in FRTL-5 thyroid cells by gene silencing and expression microarray analysis. *PLoS One* **6**: e25162.
- Di Palma T, D'Andrea B, Liguori GL, Liguoro A, de Cristofaro T, Del Prete D, Pappalardo A, Mascia A, Zannini M. 2009. TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation. *Exp Cell Res* **315**: 162-175.
- Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. 2003. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* **278**: 3395-3402.
- Dichtel-Danjoy ML, Caldeira J, Casares F. 2009. SoxF is part of a novel negative-feedback loop in the wingless pathway that controls proliferation in the Drosophila wing disc. *Development* **136**: 761-769.
- Dumont JE. 1971. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm* **29**: 287-412.
- Dunn AD. 1980. Properties of an iodinating enzyme in the ascidian endostyle. *Gen Comp Endocrinol* **40**: 484-493.
- Eichberger T, Regl G, Ikram MS, Neill GW, Philpott MP, Aberger F, Frischauf AM. 2004. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* **122**: 1180-1187.
- Elluru RG, Whitsett JA. 2004. Potential role of Sox9 in patterning tracheal cartilage ring formation in an embryonic mouse model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **130**: 732-736.
- Espinoza CR, Schmitt TL, Loos U. 2001. Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* **27**: 59-67.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156.
- Fagman H, Amendola E, Parrillo L, Zoppoli P, Marotta P, Scarfo M, De Luca P, de Carvalho DP, Ceccarelli M, De Felice M et al. 2011. Gene expression profiling at early organogenesis reveals both common and diverse mechanisms in foregut patterning. *Dev Biol* **359**: 163-175.

- Fagman H, Andersson L, Nilsson M. 2006. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn* **235**: 444-455.
- Fagman H, Grande M, Gritli-Linde A, Nilsson M. 2004. Genetic deletion of sonic hedgehog causes hemiagenesis and ectopic development of the thyroid in mouse. *Am J Pathol* **164**: 1865-1872.
- Fagman H, Nilsson M. 2011. Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol* **46**: R33-42.
- Fenton MS, Marion KM, Hershman JM. 2008. Identification of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator as an activator of the human sodium/iodide symporter upstream enhancer. *Endocrinology* **149**: 2592-2606.
- Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Martinez AM, Gomez-Lopez G, Santisteban P. 2013. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS One* **8**: e62849.
- Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Santisteban P. 2015. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nat Rev Endocrinol* **11**: 29-42.
- Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G. 1987. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* **7**: 3365-3370.
- Garcia-Lavandeira M, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Perez-Romero S, Senra A, Dieguez C, Japon MA, Alvarez CV. 2012. Craniopharyngiomas express embryonic stem cell markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as pituitary stem cells but do not coexpress RET/GFRA3 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: E80-87.
- Garcia-Rendueles AR, Rodrigues JS, Garcia-Rendueles ME, Suarez-Farina M, Perez-Romero S, Barreiro F, Bernabeu I, Rodriguez-Garcia J, Fugazzola L, Sakai T et al. 2017. Rewiring of the apoptotic TGF-beta-SMAD/NFkappaB pathway through an oncogenic function of p27 in human papillary thyroid cancer. *Oncogene* **36**: 652-666.
- Garcia B, Santisteban P. 2002. PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* **16**: 342-352.
- Garside VC, Cullum R, Alder O, Lu DY, Vander Werff R, Bilenky M, Zhao Y, Jones SJ, Marra MA, Underhill TM et al. 2015. SOX9 modulates the expression of key transcription factors required for heart valve development. *Development* **142**: 4340-4350.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**: 386-401.
- Gonen N, Quinn A, O'Neill HC, Koopman P, Lovell-Badge R. 2017. Correction: Normal Levels of Sox9 Expression in the Developing Mouse Testis Depend on the TES/TESCO Enhancer, but This Does Not Act Alone. *PLoS Genet* **13**: e1006584.
- Guazzi S, Lonigro R, Pintonello L, Boncinelli E, Di Lauro R, Mavilio F. 1994. The thyroid transcription factor-1 gene is a candidate target for regulation by Hox proteins. *EMBO J* **13**: 3339-3347.
- Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. 1990. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J* **9**: 3631-3639.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**: 245-250.
- Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrughe B. 2000. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* **20**: 4149-4158.

- Ikeda K, Clark JC, Shaw-White JR, Stahlman MT, Boutell CJ, Whitsett JA. 1995. Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* **270**: 8108-8114.
- Isozaki O, Santisteban P, Chan J, Grollman E, Kohn L. 1987. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulate differentiation as well as growth in FRTL-5 cells. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* **281**: 288-292.
- Jackson DA, Rowader KE, Stevens K, Jiang C, Milos P, Zaret KS. 1993. Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol Cell Biol* **13**: 2401-2410.
- Jeannot P, Callot C, Baer R, Duquesnes N, Guerra C, Guillermet-Guibert J, Bachs O, Besson A. 2015. Loss of p27Kip(1) promotes metaplasia in the pancreas via the regulation of Sox9 expression. *Oncotarget* **6**: 35880-35892.
- Jo A, Denduluri S, Zhang B, Wang Z, Yin L, Yan Z, Kang R, Shi LL, Mok J, Lee MJ et al. 2014. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis* **1**: 149-161.
- Johansson E, Andersson L, Ornros J, Carlsson T, Ingesson-Carlsson C, Liang S, Dahlberg J, Jansson S, Parrillo L, Zoppoli P et al. 2015. Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. *Development* **142**: 3519-3528.
- Kamachi Y, Kondoh H. 2013. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**: 4129-4144.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* **16**: 182-187.
- Kambe F, Nomura Y, Okamoto T, Seo H. 1996. Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Endocrinol* **10**: 801-812.
- Kameda Y. 2016. Cellular and molecular events on the development of mammalian thyroid C cells. *Dev Dyn* **245**: 323-341.
- Kameda Y, Nishimaki T, Chisaka O, Iseki S, Sucov HM. 2007. Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. *J Histochem Cytochem* **55**: 1075-1088.
- Kang HC, Ohmori M, Harii N, Endo T, Onaya T. 2001. Pax-8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor-beta1. *Endocrinology* **142**: 267-275.
- Kawaguchi Y. 2013. Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors. *J Clin Invest* **123**: 1881-1886.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. 1996. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* **10**: 60-69.
- Kimura S, Ward JM, Minoo P. 1999. Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie* **81**: 321-327.
- Koumariou P, Gomez-Lopez G, Santisteban P. 2017. Pax8 controls thyroid follicular polarity through cadherin-16. *J Cell Sci* **130**: 219-231.
- Krude H. 2014. Evolution, child development and the thyroid: a phylogenetic and ontogenetic introduction to normal thyroid function. *Endocr Dev* **26**: 1-16.
- Kurmann AA, Serra M, Hawkins F, Rankin SA, Mori M, Astapova I, Ullas S, Lin S, Bilodeau M, Rossant J et al. 2015. Regeneration of Thyroid Function by Transplantation of Differentiated Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**: 527-542.
- Kusakabe T, Kawaguchi A, Hoshi N, Kawaguchi R, Hoshi S, Kimura S. 2006. Thyroid-specific enhancer-binding protein/NKX2.1 is required for the maintenance of ordered architecture and function of the differentiated thyroid. *Mol Endocrinol* **20**: 1796-1809.

- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**: 223-226.
- Lancaster MA, Knoblich JA. 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**: 1247125.
- Lazzereschi D, Coppa A, Minicione G, Lavitrano M, Fragomele F, Colletta G. 1997. The phosphatase inhibitor okadaic acid stimulates the TSH-induced G1-S phase transition in thyroid cells. *Exp Cell Res* **234**: 425-433.
- Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S. 2007. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev* **55**: 237-247.
- Ledent C, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M. 1992. Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism. *EMBO J* **11**: 537-542.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**: 2336-2346.
- Leoni SG, Sastre-Perona A, De la Vieja A, Santisteban P. 2016. Selenium Increases Thyroid-Stimulating Hormone-Induced Sodium/Iodide Symporter Expression Through Thioredoxin/Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1-Dependent Regulation of Paired Box 8 Binding Activity. *Antioxid Redox Signal* **24**: 855-866.
- Leung VY, Gao B, Leung KK, Melhado IG, Wynn SL, Au TY, Dung NW, Lau JY, Mak AC, Chan D et al. 2011. SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genet* **7**: e1002356.
- Li XM, Piao YJ, Sohn KC, Ha JM, Im M, Seo YJ, Whang KU, Lee JH, Lee Y, Kim CD. 2016. Sox9 is a beta-catenin-regulated transcription factor that enhances the colony-forming activity of squamous cell carcinoma cells. *Mol Med Rep* **14**: 337-342.
- Liu JA, Wu MH, Yan CH, Chau BK, So H, Ng A, Chan A, Cheah KS, Briscoe J, Cheung M. 2013. Phosphorylation of Sox9 is required for neural crest delamination and is regulated downstream of BMP and canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 2882-2887.
- Longmire TA, Ikonomou L, Hawkins F, Christodoulou C, Cao Y, Jean JC, Kwok LW, Mou H, Rajagopal J, Shen SS et al. 2012. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **10**: 398-411.
- Ma F, Ye H, He HH, Gerrin SJ, Chen S, Tanenbaum BA, Cai C, Sowalsky AG, He L, Wang H et al. 2016. SOX9 drives WNT pathway activation in prostate cancer. *J Clin Invest* **126**: 1745-1758.
- Ma R, Morshed SA, Latif R, Davies TF. 2015. Thyroid cell differentiation from murine induced pluripotent stem cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 56.
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. 1998. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **19**: 87-90.
- Marfil V, Moya M, Pierreux CE, Castell JV, Lemaigre FP, Real FX, Bort R. 2010. Interaction between Hhex and SOX13 modulates Wnt/TCF activity. *J Biol Chem* **285**: 5726-5737.
- Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF. 2002. Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15776-15781.
- Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. 2000. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**: 2433-2445.
- Massague J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 616-630.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**: 2783-2810.
- May PB, Donabedian RK. 1973. Thyrotropin releasing hormone (TRH) mediated thyroid-stimulating hormone (TSH) release from human anterior pituitary tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **36**: 605-607.

- Mead TJ, Wang Q, Bhattaram P, Dy P, Afelik S, Jensen J, Lefebvre V. 2013. A far-upstream (-70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration. *Nucleic Acids Res* **41**: 4459-4469.
- Medina DL, Santisteban P. 2000. Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* **143**: 161-178.
- Medina DL, Suzuki K, Pietrarelli M, Okajima F, Kohn LD, Santisteban P. 2000. Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* **10**: 295-303.
- Mendez-Pertuz M, Sanchez-Pacheco A, Aranda A. 2003. The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J* **22**: 3102-3112.
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. 2016. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**.
- Muller K, Fuhrer D, Mittag J, Kloting N, Bluher M, Weiss RE, Many MC, Schmid KW, Krohn K. 2011. TSH compensates thyroid-specific IGF-I receptor knockout and causes papillary thyroid hyperplasia. *Mol Endocrinol* **25**: 1867-1879.
- Nakamura K, Kimura S, Yamazaki M, Kawaguchi A, Inoue K, Sakai T. 2001. Immunohistochemical analyses of thyroid-specific enhancer-binding protein in the fetal and adult rat hypothalami and pituitary glands. *Brain Res Dev Brain Res* **130**: 159-166.
- Nebi G, Cato AC. 1995. NFI/X proteins: a class of NFI family of transcription factors with positive and negative regulatory domains. *Cell Mol Biol Res* **41**: 85-95.
- Nellore A, Paziana K, Ma C, Tsygankova OM, Wang Y, Puttaswamy K, Iqbal AU, Franks SR, Lv Y, Troxel AB et al. 2009. Loss of Rap1GAP in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 1026-1032.
- Nguyen LQ, Kopp P, Martinson F, Stanfield K, Roth SI, Jameson JL. 2000. A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function. *Mol Endocrinol* **14**: 1448-1461.
- Nicolussi A, D'Inzeo S, Santulli M, Colletta G, Coppa A. 2003. TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation. *Mol Cell Endocrinol* **207**: 1-11.
- Ogasawara M, Di Lauro R, Satoh N. 1999. Ascidian homologs of mammalian thyroid peroxidase genes are expressed in the thyroid-equivalent region of the endostyle. *J Exp Zool* **285**: 158-169.
- Oguchi H, Kimura S. 1998. Multiple transcripts encoded by the thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP)/thyroid-specific transcription factor-1 (TTF-1) gene: evidence of autoregulation. *Endocrinology* **139**: 1999-2006.
- Oh CD, Lu Y, Liang S, Mori-Akiyama Y, Chen D, de Crombrughe B, Yasuda H. 2014. SOX9 regulates multiple genes in chondrocytes, including genes encoding ECM proteins, ECM modification enzymes, receptors, and transporters. *PLoS One* **9**: e107577.
- Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R. 1999. The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **19**: 2051-2060.
- Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. 2000. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* **277**: 643-649.
- Ortiz L, Aza-Blanc P, Zannini M, Cato AC, Santisteban P. 1999. The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. *J Biol Chem* **274**: 15213-15221.
- Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R, Santisteban P. 1997. Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* **272**: 23334-23339.

- Ozcan A, Shen SS, Hamilton C, Anjana K, Coffey D, Krishnan B, Truong LD. 2011. PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Mod Pathol* **24**: 751-764.
- Park E, Gong EY, Romanelli MG, Lee K. 2012. Suppression of estrogen receptor- α transactivation by thyroid transcription factor-2 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **421**: 532-537.
- Park J, Zhang JJ, Moro A, Kushida M, Wegner M, Kim PC. 2010. Regulation of Sox9 by Sonic Hedgehog (Shh) is essential for patterning and formation of tracheal cartilage. *Dev Dyn* **239**: 514-526.
- Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M. 2004. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* **276**: 464-475.
- Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M. 2000. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13144-13149.
- Pascual A, Aranda A. 2013. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 3908-3916.
- Pekary AE, Hershtman JM. 1998. Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor- β 1, and aging reduce Na⁺/I⁻ symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **139**: 703-712.
- Pellizzari L, D'Elia A, Rustighi A, Manfioletti G, Tell G, Damante G. 2000. Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells. *Nucleic Acids Res* **28**: 2503-2511.
- Perrone L, Pasca di Magliano M, Zannini M, Di Lauro R. 2000. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 203-208.
- Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D. 2000. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* **10**: 555-558.
- Piera-Velazquez S, Hawkins DF, Whitecavage MK, Colter DC, Stokes DG, Jimenez SA. 2007. Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB. *Exp Cell Res* **313**: 1069-1079.
- Pierce JG, Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* **50**: 465-495.
- Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P. 1994. Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* **13**: 5002-5012.
- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. 1990. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* **110**: 643-651.
- Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S. 2002. Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* **109**: 469-473.
- Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Marians RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M et al. 2002. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15462-15467.
- Prevostel C, Rammah-Bouazza C, Trauchessec H, Canterel-Thouennon L, Busson M, Ychou M, Blache P. 2016. SOX9 is an atypical intestinal tumor suppressor controlling the oncogenic Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* **7**: 82228-82243.
- Puppini C, D'Elia AV, Pellizzari L, Russo D, Arturi F, Presta I, Filetti S, Bogue CW, Denson LA, Damante G. 2003. Thyroid-specific transcription factors control Hex promoter activity. *Nucleic Acids Res* **31**: 1845-1852.

- Riesco-Eizaguirre G, Leoni SG, Mendiola M, Estevez-Cebrero MA, Gallego MI, Redondo A, Hardisson D, Santisteban P, De la Vieja A. 2014. NIS mediates iodide uptake in the female reproductive tract and is a poor prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **99**: E1199-1208.
- Roberts HE, Moore CA, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ. 1997. Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992. *Am J Med Genet* **71**: 29-32.
- Roger PP. 1996. Thyrotropin-dependent transforming growth factor beta expression in thyroid gland. *Eur J Endocrinol* **134**: 269-271.
- Saito J, Kohn AD, Roth RA, Noguchi Y, Tatsumo I, Hirai A, Suzuki K, Kohn LD, Saji M, Ringel MD. 2001. Regulation of FRTL-5 thyroid cell growth by phosphatidylinositol (OH) 3 kinase-dependent Akt-mediated signaling. *Thyroid* **11**: 339-351.
- Sala FG, Del Moral PM, Tiozzo C, Alam DA, Warburton D, Grikscheit T, Veltmaat JM, Bellusci S. 2011. FGF10 controls the patterning of the tracheal cartilage rings via Shh. *Development* **138**: 273-282.
- Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. 2001. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* **276**: 38527-38535.
- Santisteban P, Acebron A, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R. 1992. Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter. *Mol Endocrinol* **6**: 1310-1317.
- Santisteban P, Kohn LD, Di Lauro R. 1987. Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells. *J Biol Chem* **262**: 4048-4052.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098-1101.
- Sastre-Perona A, Santisteban P. 2014. Wnt-independent role of beta-catenin in thyroid cell proliferation and differentiation. *Mol Endocrinol* **28**: 681-695.
- Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC, Jr. 1998. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7772-7777.
- Sekido R, Lovell-Badge R. 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**: 930-934.
- Sever-Chroneos Z, Bachurski CJ, Yan C, Whitsett JA. 1999. Regulation of mouse SP-B gene promoter by AP-1 family members. *Am J Physiol* **277**: L79-88.
- Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1865-1870.
- Seymour PA, Shih HP, Patel NA, Freude KK, Xie R, Lim CJ, Sander M. 2012. A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development* **139**: 3363-3372.
- Shenkman L, Mitsuma T, Hollander CS. 1973. Modulation of pituitary responsiveness to thyrotropin-releasing hormone by triiodothyronine. *J Clin Invest* **52**: 205-209.
- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685-700.
- Shih HP, Seymour PA, Patel NA, Xie R, Wang A, Liu PP, Yeo GW, Magnuson MA, Sander M. 2015. A Gene Regulatory Network Cooperatively Controlled by Pdx1 and Sox9 Governs Lineage Allocation of Foregut Progenitor Cells. *Cell Rep* **13**: 326-336.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. 2002. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* **8**: 1145-1152.
- Sim H, Argentaro A, Harley VR. 2008. Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol Metab* **19**: 213-222.

- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240-244.
- Smith JM, Koopman PA. 2004. The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet* **20**: 4-8.
- Song S, Maru DM, Ajani JA, Chan CH, Honjo S, Lin HK, Correa A, Hofstetter WL, Davila M, Stroehlein J et al. 2013. Loss of TGF-beta adaptor beta2SP activates notch signaling and SOX9 expression in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* **73**: 2159-2169.
- Suzuki K, Kobayashi Y, Katoh R, Kohn LD, Kawaoi A. 1998. Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells. *Endocrinology* **139**: 3014-3017.
- Suzuki S, Kondo Y. 1973. Thyroidal morphogenesis and biosynthesis of thyroglobulin before and after metamorphosis in the lamprey, *Lampetra reissneri*. *Gen Comp Endocrinol* **21**: 451-460.
- Symon A, Harley V. 2017. SOX9; A genomic view of tissue specific expression and action. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676.
- Tell G, Pellizzari L, Cimarosti D, Pucillo C, Damante G. 1998. Ref-1 controls pax-8 DNA-binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 178-183.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-1147.
- Topol L, Chen W, Song H, Day TF, Yang Y. 2009. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem* **284**: 3323-3333.
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI et al. 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* **139**: 1130-1142.
- Uwanogho D, Rex M, Cartwright EJ, Pearl G, Healy C, Scotting PJ, Sharpe PT. 1995. Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech Dev* **49**: 23-36.
- Van Renterghem P, Dremier S, Vassart G, Christophe D. 1995. Study of TTF-1 gene expression in dog thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* **112**: 83-93.
- Vassart G, Dumont JE. 1992. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* **13**: 596-611.
- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G. 2001. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 234-238.
- Villacorte M, Delmarcelle AS, Lernoux M, Bouquet M, Lemoine P, Bolsee J, Umans L, de Sousa Lopes SC, Van Der Smissen P, Sasaki T et al. 2016. Thyroid follicle development requires Smad1/5- and endothelial cell-dependent basement membrane assembly. *Development* **143**: 1958-1970.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E et al. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**: 1111-1120.
- Wandzioch E, Zaret KS. 2009. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. *Science* **324**: 1707-1710.
- Wegner M. 1999. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* **27**: 1409-1420.
- Weider M, Wegner M. 2017. SoxE factors: Transcriptional regulators of neural differentiation and nervous system development. *Semin Cell Dev Biol* **63**: 35-42.
- Wendl T, Adzic D, Schoenebeck JJ, Scholpp S, Brand M, Yelon D, Rohr KB. 2007. Early developmental specification of the thyroid gland depends on hox-expressing surrounding tissue and on FGF signals. *Development* **134**: 2871-2879.

- Wistuba J, Mittag J, Luetjens CM, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E, Bauer K. 2007. Male congenital hypothyroid Pax8^{-/-} mice are infertile despite adequate treatment with thyroid hormone. *J Endocrinol* **192**: 99-109.
- Woloshin PI, Walton KM, Reh fuss RP, Goodman RH, Cone RD. 1992. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line. *Mol Endocrinol* **6**: 1725-1733.
- Wright GM, Youson JH. 1976. Transformation of the endostyle of the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L., during metamorphosis. I. Light microscopy and autoradiography with 125I1. *Gen Comp Endocrinol* **30**: 243-257.
- Yi M, Tong GX, Murry B, Mendelson CR. 2002. Role of CBP/p300 and SRC-1 in transcriptional regulation of the pulmonary surfactant protein-A (SP-A) gene by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *J Biol Chem* **277**: 2997-3005.
- Yin C. 2016. Molecular mechanisms of Sox transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas. *Semin Cell Dev Biol*.
- Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Sasaki N, Yamamoto Y, Miake J, Fukui H, Shimizu H, Okamura T, Okura T et al. 2004. Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology* **145**: 4301-4308.
- Yun JY, Kim YA, Choe JY, Min H, Lee KS, Jung Y, Oh S, Kim JE. 2014. Expression of cancer stem cell markers is more frequent in anaplastic thyroid carcinoma compared to papillary thyroid carcinoma and is related to adverse clinical outcome. *J Clin Pathol* **67**: 125-133.
- Zaballos MA, Garcia B, Santisteban P. 2008. Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol Endocrinol* **22**: 1183-1199.
- Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. 1997. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* **16**: 3185-3197.
- Zaret KS, Carroll JS. 2011. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* **25**: 2227-2241.
- Zarrilli R, Formisano S, Di Jeso B. 1990. Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol Endocrinol* **4**: 39-45.
- Zhao L, Li G, Zhou GQ. 2009. SOX9 directly binds CREB as a novel synergism with the PKA pathway in BMP-2-induced osteochondrogenic differentiation. *J Bone Miner Res* **24**: 826-836.

ANEXO



ANEXO I: PUBLICACIONES RELACIONADAS

Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Martinez AM, Gomez-Lopez G, Santisteban P. 2013. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS One* **8**: e62849.

Fernandez LP, Lopez-Marquez A, Santisteban P. 2015. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease. *Nat Rev Endocrinol* **11**: 29-42.

New Insights into FoxE1 Functions: Identification of Direct FoxE1 Targets in Thyroid Cells

Lara P. Fernández¹, Arístides López-Márquez¹, Ángel M. Martínez^{1,2}, Gonzalo Gómez-López², Pilar Santisteban^{1*}

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, and Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, Spain, ² Bioinformatics Unit, Structural Biology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

Abstract

Background: FoxE1 is a thyroid-specific forkhead transcription factor essential for thyroid gland development, as well as for the maintenance of the thyroid differentiated state in adults. FoxE1 recognizes and binds to a short DNA sequence present in thyroglobulin (*Tg*) and thyroperoxidase (*Tpo*) promoters, but FoxE1 binding to regulatory regions other than *Tg* and *Tpo* promoters remains almost unexplored. Improving knowledge of the regulatory functions of FoxE1 is necessary to clarify its role in endocrine syndromes and cancer susceptibility.

Methodology/Principal Finding: In order to further investigate downstream FoxE1 targets, we performed a genome-wide expression screening after knocking-down *FoxE1* and obtained new insights into FoxE1 transcriptional networks in thyroid follicular cells. After validation, we confirmed *Adamts9*, *Cdh1*, *Duox2* and *S100a4* as upregulated genes and *Casp4*, *Crel2*, *Dusp5*, *Etv5*, *Hsp5a*, *Nr4a2* and *Tm4sf1* as downregulated genes when *FoxE1* was silenced. In promoter regions of putative FoxE1-regulated genes and also in the promoters of the classical thyroid genes *Nis*, *Pax8* and *Ttf1*, we performed an *in silico* search of the FoxE1 binding motif that was in close proximity to the NF1/CTF binding sequence, as previously described for other forkhead factors. Using chromatin immunoprecipitation we detected specific *in vivo* FoxE1 binding to novel regulatory regions in two relevant thyroid genes, *Nis* and *Duox2*. Moreover, we demonstrated simultaneous binding of FoxE1 and NF1/CTF to the *Nis* upstream enhancer region, as well as a clear functional activation of the *Nis* promoter by both transcription factors.

Conclusions/Significance: In search for potential downstream mediators of FoxE1 function in thyroid cells, we identified two novel direct FoxE1 target genes. To our knowledge, this is the first evidence regarding the implication of *Nis* and *Duox2* in executing the transcriptional program triggered by FoxE1. Furthermore, this study points out the important role of FoxE1 in the regulation of a large number of genes in thyroid cells.

Citation: Fernández LP, López-Márquez A, Martínez ÁM, Gómez-López G, Santisteban P (2013) New Insights into FoxE1 Functions: Identification of Direct FoxE1 Targets in Thyroid Cells. PLoS ONE 8(5): e62849. doi:10.1371/journal.pone.0062849

Editor: Alfredo Fusco, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Italy

Received: December 20, 2012; **Accepted:** March 26, 2013; **Published:** May 13, 2013

Copyright: © 2013 Fernández et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants BFU-2010-16025 from the Dirección General de Proyectos de Investigación; RD06/0020/0060 and RD12/0036/0030 from FIS, Instituto de Salud Carlos III; and S2011/BMD-2328 TIRONET project from the Comunidad de Madrid (Spain). LP Fernández holds a postdoctoral grant of the Juan de la Cierva programme of the Spanish Government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: psantisteban@iib.uam.es

Introduction

Coordinated expression of thyroid transcription factors Pax8, FoxE1/Ttf2 and Ttf1/Nkx2-1 is essential for maintaining the differentiated thyroid function, which involves synthesis and secretion of thyroid hormones. These factors are encoded by genes with paired box, forkhead box and homeobox domains, respectively. Thyroid hormones are iodinated, and therefore thyroid cells actively concentrate iodide through a sodium dependent co-transporter, Nis, a glycoprotein located in the basal membrane. The iodide is transported to the apical membrane, where thyroperoxidase (Tpo) iodinates the tyrosine residues of the main thyroid protein thyroglobulin (Tg) that serves as a storage for thyroid hormones [1,2].

FoxE1, formerly known as thyroid transcription factor 2 or Ttf2, is a thyroid-specific transcription factor that belongs to the

forkhead/winged-helix family [3]. Fox proteins are a superfamily of evolutionarily conserved transcriptional regulators, which share a highly conserved forkhead box or winged helix DNA binding domain. Forkhead factors control a wide range of biological processes, and some of them are key regulators of embryogenesis and play important roles in cell differentiation and development, hormone responsiveness and aging [4,5].

FoxE1, as a member of the Fox family, is able to interact with nucleosomes through its winged-helix DNA binding domain and to alter chromatin structure, creating a locally exposed domain necessary for the action of other transcription factors [6]. This intrinsic property defines FoxE1 as a pioneer transcription factor [7], essential during thyroid development and differentiation, as well as for the maintenance of the thyroid differentiated state in adults [2].

FoxE1-null mice exhibit an ectopic (50%) or completely absent (50%) thyroid gland and severe cleft palate. Consequently, FoxE1 seems to be crucial either for the migration of the thyroid cell precursors or for repressing differentiation until migration has completed [8].

Human *FOXE1* mutations cause the Bamforth–Lazarus syndrome (OMIM 241850), which is associated with congenital hypothyroidism, cleft palate and spiky hair, with or without choanal atresia, bifid epiglottis and ocular hypertelorism [9,10]. Moreover, *FOXE1* variations have been associated with susceptibility to several types of cancer [11,12,13], including papillary thyroid cancer [14,15,16].

FoxE1 was initially identified as a nuclear protein [3] that recognizes and binds to DNA sequences present in the promoters of two thyroid-specific genes: thyroglobulin (*Tg*) [17] and thyroperoxidase (*Tpo*) [18]. FoxE1 usually promotes transcriptional activation of the *Tg* and *Tpo* genes; however, it can also act as a promoter-specific transcriptional repressor of both genes [19].

Putative FoxE1-binding sites previously identified in the *Tg* and *Tpo* promoters share the core sequence AAACA [20]. Moreover, in the *Tpo* promoter FoxE1 forms part of an interaction-complex together with the transcription factor NF1/CTF, whose final result is to turn on the expression of the *Tpo* gene in response to external hormonal stimuli [21].

Nevertheless, FoxE1 binding to DNA sequences other than the *Tg* and *Tpo* promoters remains almost unexplored. Only two studies have reported other FoxE1 targets, but both were conducted in heterologous expression systems [22,23].

In order to further investigate FoxE1 downstream targets in thyroid epithelial cells, we performed a genome-wide screening using expression arrays in *FoxE1* knock-down cells followed by a search of direct target genes containing in their promoters both FoxE1 and NF1/CTF binding sites. The results obtained in this study provide new insights into FoxE1 transcriptional networks in differentiated thyroid cells and predict involvement of FoxE1 in relevant biological processes and pathways. These data may lead to a better understanding of thyroid biology.

Materials and Methods

Cell Culture

PCCl3 cells, a continuous line of rat thyroid follicular cells [24], were cultured in Coon's modified Ham's F-12 medium supplemented with 5% donor calf serum and a six-hormone mixture [25]. These cells express thyroid-specific genes (*Tg*, *Tpo*, and *Nis*) as well as thyroid-specific transcription factors (*Ttf1*, FoxE1, and *Pax8*) [26] and therefore constitute a good model system to study differentiation and growth regulation in a thyroid epithelial cell setting.

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum.

RNA Interference

PCCl3 cells were transfected with 25 nM of FoxE1 siRNA (Rat FoxE1 ON-TARGETplus SMARTpool) or with scrambled siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool) using DharmaFECT 1 Transfection Reagent and following the manufacturer's protocol (Dharmacon, Denver, USA).

In order to establish optimal conditions for *FoxE1* silencing, duplicate samples were harvested at different time points (24, 48 and 72 h) after transfection, and total protein was extracted. *FoxE1* silencing was tested by western blotting using a polyclonal FoxE1 antibody (Biopat, Milan, Italy) (data not shown). Once 48 hours was defined as the best time point for *FoxE1* silencing, we

performed additional transfections, four biological replicates for each condition, to isolate total protein and total RNA using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's recommended protocol.

Expression Arrays

FoxE1-dependent gene expression was tested using expression arrays (Agilent SurePrint Rat 60 K). We established two main comparisons: FoxE1-silenced PCCl3 cells (siFoxE1 PCCl3) vs. scrambled siRNA-treated PCCl3 cells (siScramble PCCl3) and FoxE1-silenced PCCl3 cells vs. wild type PCCl3 cells (wt PCCl3). This last condition was included to consistently analyse expression array signals in basal cellular conditions. Each comparison was performed using quadruplicates and dye swaps (Experimental design shown in Fig. 1A).

Ten µg of total RNA for each condition were sent to the Genomics Core Unit of the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO, Madrid) for RNA quality evaluation, amplification, labelling and hybridization to Agilent SurePrint Rat 60 K arrays according to the manufacturer's protocols.

Signal quantification was carried out with Agilent Feature Extraction Software 10.7 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), using default analysis parameters for Agilent's whole rat genome 60 K gene expression arrays. To normalize the data set, we performed loess within-array normalization and quantiles between-array normalization. Differential expression analysis was done using Bioconductor's limma package (<http://www.bioconductor.org>). At a later stage, we used the file "SurePrint G3 Rat GE 8×60 K Microarray" to obtain the annotations of the rat genome from Agilent. Genes that showed adjusted p-values <0.005 both in siFoxE1 vs. wild type and in siFoxE1 vs. siScramble PCCl3 cells were considered differentially expressed. Functional analysis of Gene Ontology (GO) terms was carried out using the FatiGO tool and gene set enrichment analysis was performed using FatiScan [27,28]. All microarray data can be downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) database under accession number GSE42497.

Experimental Validation of Expression Array Data

Technical validations of expression data were performed by real-time quantitative PCR (qPCR) and western blots after performing four independent experiments of *FoxE1* silencing.

Total RNA was isolated from PCCl3 cells after silencing following the standard TRIzol Reagent protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was reverse transcribed with random primers and quantitative PCR reactions were assembled in triplicate using the SYBR Green PCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA) following the manufacturer's protocol. Expression level changes were studied for 6 thyroid-specific genes (*FoxE1*, *Tpo*, *Tg*, *Nis*, *Pax8* and *Ttf1*) as well as for 12 putative FoxE1-regulated genes, using beta-glucuronidase (*Gus*) for gene expression normalization (oligos are shown in Table S1).

Total protein extracts were obtained by scraping the cells in RIPA buffer (1% PBS, 0.5% (wt/vol) Nonidet, 0.1% (wt/vol) sodium deoxycholate, 0.1% SDS). Protein extracts (30 µg) were separated on 10% SDS-PAGE gels and immunodetected after western blotting. FoxE1 antibody was from Biopat (Milan, Italy), Actin and Cdh1 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA), and *Nis* and *Duox2* antibodies were generous gifts from Dr. N. Carrasco (Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA) [29] and Dr. C. Dupuy (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) [30], respectively.

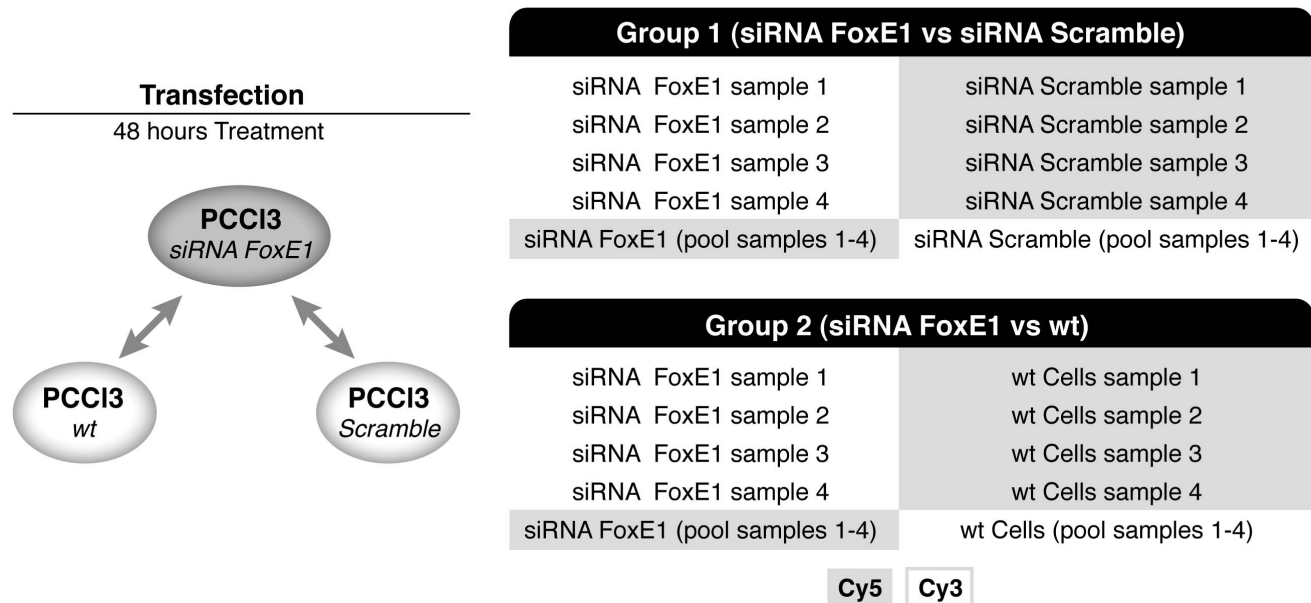
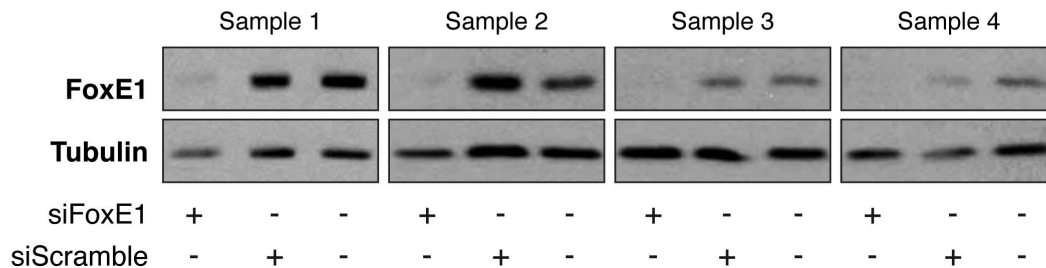
A**RNA-Expression Arrays Experimental Design****B**

Figure 1. Experimental design and FoxE1 protein levels after 48 hours of silencing. *Panel A:* Experimental design of expression array experiments. Two comparisons were done: FoxE1-silenced PCCI3 cells (siFoxE1 PCCI3) vs. scrambled siRNA-treated PCCI3 cells (siScramble PCCI3), and FoxE1-silenced PCCI3 cells vs. wild type PCCL3 cells (wt PCCI3). Each comparison was performed in quadruplicate and using dye swaps. *Panel B:* Western Blot of extracts from control, siScramble and siFoxE1-treated cells from quadruplicate samples used for microarray analysis. Hybridizations were done with anti-FoxE1 antibodies; anti-tubulin antibodies were used as loading controls.

doi:10.1371/journal.pone.0062849.g001

Motif Search

We searched for FoxE1 binding sites in promoter regions (+/-1000 bp relative to the transcription start site) of genes statistically significantly regulated by FoxE1 (p-values <0.005). We performed an automated search of genes containing both the FoxE1 core binding site [5'-ACAAA-3'] and the NF1/CTF binding motif [5'-TTGG-3'] localised between 5 to 30 bp from the FoxE1 site, as previously described for FoxE1 binding within the *Tpo* promoter [5'-TTGG-(5-30)bp-ACAAA-3'] [21]. FASTA promoter sequences of FoxE1-regulated genes, as well as promoter sequences of their orthologous genes, were extracted from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org>).

ChIP and ReChIP Assays

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and sequential ChIP (ReChIP) were performed using the Diagenode HighCell ChIP kit following the manufacturer's standard protocol. Cross-linked PCCI3 chromatin was immunoprecipitated using polyclonal antibodies against FoxE1 (Biopat, Milan, Italy) and NF1 (Abcam, Cambridge, UK). Two independent ChIP experiments were performed using two different batches of Biopat FoxE1 antibodies.

ReChIP was used to analyse simultaneous binding of FoxE1 and NF1/CTF proteins to a common DNA region. After a first immunoprecipitation with FoxE1 antibody using the Diagenode HighCell ChIP kit, samples were rinsed with RIPA buffer, and the first antibody was stripped from the beads by incubating in 1% SDS at 65°C for 15 minutes. Then a second round of immunoprecipitation with NF1 antibody was performed using

the same Diagenode HighCell ChIP kit and following the manufacturer's standard protocol.

FoxE, NF1 and FoxE1/NF1 -immunoprecipitated and input samples were analysed by real-time PCR using specific primers for the analysed regions (see Table S2). The known FoxE1 targets *Tpo* and *Tg* were used as positive IP controls whereas intron and promoter regions of *Gad1* (glutamate decarboxylase 1) and *Afm* (afamin or alpha-albumin) were used as negative controls. qPCR reactions were assembled in triplicate using the SYBR Green PCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA), following the manufacturer's protocol. The enrichment of target sequences in ChIP material was calculated relative to the *Afm* and *Gad1* negative controls, and normalized to their relative amplification in the input sample [31].

Transfection and Luciferase Assays

HeLa cells were plated at a density of 2×10^5 cells/well in 6-well tissue culture plates, 24 h before transfection. Transfections were performed by calcium phosphate co-precipitation as described previously [17]. The rat promoter pNIS 2.8-Luc, which contains the NIS Upstream Enhancer (NUE) [32] was transiently transfected alone (1.5 µg) or in combination with 1 µg of the expression vectors CMV-FoxE1 (formerly CMV-TTF2) [3] or RSV-CTF/NF1-C [33]. One hundred nanograms of the CMV-Renilla vector were cotransfected to assess transfection efficiency. After 48 h, cells were harvested, lysed, and analysed for Luciferase and Renilla activities by the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Madison WI). The promoter activity in cells transfected with expression vectors was determined as the ratio between luciferase and Renilla activities, relative to the ratio obtained in cells transfected with the corresponding control vectors. The results shown are the average \pm SD of six different experiments performed in triplicate. Statistical significance was determined by *t* test analysis (two-tailed), and differences were considered significant at $p < 0.05$. Western blots were done where indicated to determine the levels of expression of the transfected expression vectors (data not shown).

Results

Gene Expression Profile of FoxE1-silenced Cells

In order to further investigate FoxE1 function and to identify putative FoxE1 target genes in thyroid cells, we performed whole genome microarray analysis in PCCl3 thyroid cells after knocking down *FoxE1*. Silencing was performed for 48 h after transfection. Data from four independent silencing experiments were analysed. We obtained a FoxE1 silencing grade of more than 85% (Fig. 1B). Statistically significant probes ($p < 0.005$) from the siFoxE1 PCCl3 vs siScrambl PCCl3 comparison showed 74 differentially deregulated probes, including 24 upregulated and 50 downregulated probes. Comparison of siFoxE1 PCCl3 vs wt PCCl3 generated 211 differentially regulated probes, consisting of 99 upregulated and 112 downregulated probes (Table 1). Array results of both comparisons are shown in datasets S1 and S2, respectively. Statistically significant probes ($p < 0.005$) from both comparisons are shown in Table S3. Combination of significant results from both comparisons showed 55 differentially deregulated genes, 17 of which were upregulated and 38 were downregulated (Tables 1 and 2). As expected, expression of previously known FoxE1 targets (*Tpo* and *Tg*) was downregulated, in the absence of FoxE1, in both comparisons.

Gene ontology (GO) analysis using FatiGO identified common GO terms, including endoplasmic reticulum (ER) overload response (GO:0006983), response to ER stress (GO:0034976),

Table 1. Summary of FoxE1 microarray results in PCCl3 cells.

	siFoxE1 vs siScrambl		siFoxE1 vs WT		Common
	Probes	Genes	Probes	Genes	Genes
Total	74	64	211	183	55
Upregulated	24	24	99	87	17
Downregulated	50	40	112	96	38

Number of statistically significant probes and genes ($p < 0.005$) after Foxe1 silencing; results are shown for each type of comparison performed, as well as for the combined analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0062849.t001

cellular response to glucose starvation (GO:0042149), protein folding (GO:0006457), heat shock protein binding, and oxidoreductase activity acting on sulfur group of donors, disulfide as acceptor (GO:0016671).

Independent Validation of Genes Regulated by FoxE1 Silencing

We performed validations of microarray data using four independent *FoxE1* silencing experiments, 48 h after siRNA transfection. First of all, we analysed expression levels of FoxE1, in order to check and confirm its inhibition at the mRNA level. We also checked the mRNA expression status of the FoxE1 target genes *Tpo* and *Tg*, as well as mRNA levels of the classical, most representative, thyroid genes: the thyroid iodide symporter gene, *Nis*, and thyroid transcription factors *Pax8* and *Ttf1* (Fig. 2A).

Moreover, we validated 12 genes randomly chosen from the list of putative FoxE1 targets, 5 of which were upregulated and 7 of which were downregulated after *FoxE1* silencing (Table 2). Genes selected for this validation included: metalloproteinase *Adams9*; cadherin 1 (*Cdh1*), a cell-cell adhesion glycoprotein; *Crip2*, a repressor of NF-kappaB; dual oxidase 2 (*Duox2*), a glycoprotein located at the apical membrane of thyroid follicular cells; *S100a4*, a calcium-binding protein; caspase 4 (*Casp4*), an apoptosis-related cysteine peptidase; the cysteine-rich with GF-like domains protein 2, *Crel2*; dual specificity phosphatase 5 (*Dusp5*); transcription factor *Ets5*; 70 kDa heat shock protein 5 (*Hsp5a*); steroid-thyroid hormone-retinoid receptor *Nr4a2*; and transmembrane 4L six family member 1, *Tm4sf1*.

After *FoxE1* silencing, qRT-PCR analysis confirmed downregulation of FoxE1 as well as its previously described target genes *Tpo* and *Tg* [17,18]. Interestingly, we also observed inhibition of *Nis*, and its mRNA levels were decreased even more than *Tg* mRNA levels (Fig. 2A). We confirmed the microarray data for selected genes (Fig. 2B) with the only exception of the *Crip2* gene, whose qRT-PCR expression levels did not show differences after *FoxE1* silencing. All validation experiments were performed four times, attesting to the robustness of the results.

We confirmed that mRNA levels of *Adams9*, *Cdh1*, *Duox2* and *S100a4* were upregulated, and those of *Casp4*, *Crel2*, *Dusp5*, *Ets5*, *Hsp5a*, *Nr4a2* and *Tm4sf1* were downregulated when FoxE1 was silenced in thyroid cells.

The protein expression of FoxE1 was analysed in order to check and confirm its inhibition at the protein level. We then checked protein levels of three FoxE1 putative target genes, *Nis*, *Duox2* and *Cdh1* (Figs 2C and 2D). After *FoxE1* silencing, *Duox2* protein levels did not change, but we confirmed inhibition of *Nis* expression and overexpression of *Cdh1*, at protein level.

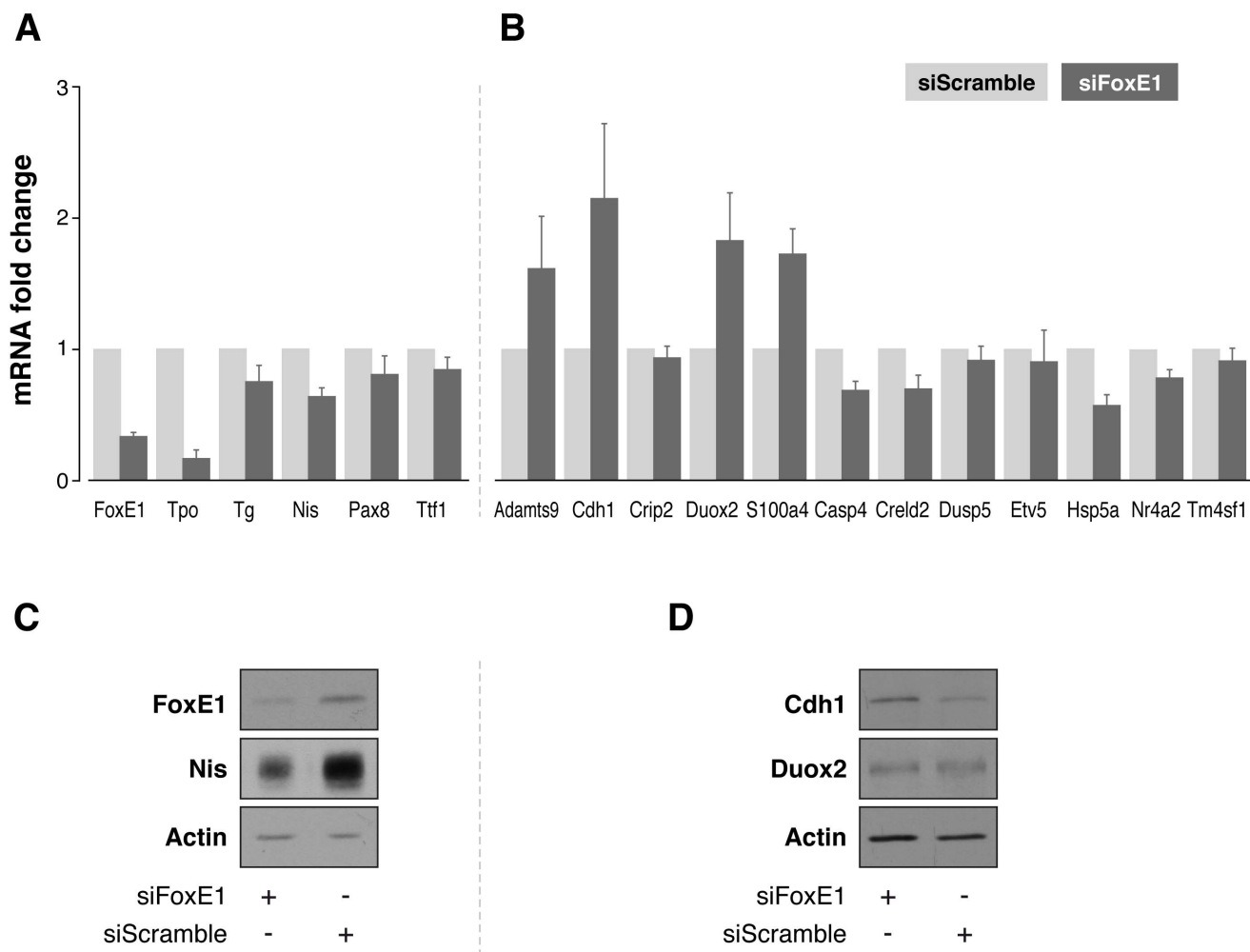


Figure 2. Experimental validation of microarray results by qRT-PCR and western blotting. Relative expression assessed by means of qRT-PCR of 6 thyroid-specific genes (panel A) and 12 additional genes differentially down- and upregulated in FoxE1-silenced PCCl3 cells (panel B). As FoxE1-dependent positive controls, we evaluated Tpo and Tg mRNA expression levels. Relative gene expression in siFoxE1 samples was calculated using the corresponding siScramble samples as a reference (=1). Results are mean \pm SEM of four independent experiments. Total protein extracts were prepared and submitted to western blot analysis to assess the protein levels of FoxE1 and Nis (panel C), and of Cdh1 and Duox2 (panel D). Actin was used as loading control. Representative western blot assays of four independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pone.0062849.g002

Identification and Functional Analysis of Direct FoxE1 Targets

With the aim of investigating new direct FoxE1 targets, first we searched for the specific FoxE1 core binding sequence, AAACA, in promoter regions of putative FoxE1 regulated genes (± 1000 pb). However, AAACA is a short sequence that can be easily found at random in the genome. We therefore performed an automatic search in the promoter sequences for FoxE1 binding sites in close proximity (5–30 bp) to the NF1/CTF binding motif, [5'-TTGG-(5–30)bp-ACAAA-3'], as previously described for FoxE1 binding to the *Tpo* promoter [21] and for other forkhead family members [34].

FoxE1-NF1/CTF binding sequences were present in promoter regions of 26 out of 55 differentially FoxE1-regulated genes. Results are summarized in Table 3. Considering their previously described function in thyroid biology, we selected three of these genes: *Duox2*, *Cdh1* and *Nr4a2* for performing ChIP *in vivo* analysis of FoxE1 binding to their promoters.

We also wanted to study in more detail the role of FoxE1 in Nis regulation (Fig. 2A). As we detected that Nis mRNA levels were even more strongly reduced than Tg mRNA levels, we tried to find FoxE1-NF1/CTF binding sequences in both the Nis proximal promoter (± 1000 pb) and in the Nis upstream enhancer element (NUE) localised between -2495 and -2264 bp [35]. A FoxE1-NF1/CTF binding sequence was detected in the NUE, close to a previously described Pax8 binding sequence [35] (Fig. 3A), but not in the proximal Nis promoter.

In order to analyse *in vivo* FoxE1 binding to *Duox2*, *Cdh1*, *Nr4a2* and *Nis* promoter sequences, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) using a polyclonal antibody against FoxE1. We analysed immunoprecipitated DNA of two independent experiments using qPCR. Results of IP ratios normalized to the *Afm* negative control are shown in Fig. 4. The same results were obtained when we used *Gad1* as a negative control (data not shown). Previously described FoxE1 binding sequences in the *Tg* and *Tpo* promoters were used as positive controls.

The FoxE1 antibody precipitated FoxE1 target sequences in the *Tg* and *Tpo* promoters with relative immunoprecipitation (IP)

Table 2. Description of statistically genes significantly ($p < 0.005$) regulated by FoxE1.

Gene	Status	Selected for validation	Description
<i>Ahcy</i>	Downreg.	No	Catalyzes the reversible hydrolysis of S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) to adenosine (Ado) and L-homocysteine (Hcy).
<i>Amigo3</i>	Downreg.	No	Adhesion molecule with Ig-like domain 3.
<i>Ankrd37</i>	Downreg.	No	Ankyrin repeat domain 37, ANKRD37 is a novel HIF-1-target gene.
<i>Atmin</i>	Downreg.	No	ATM interactor, an essential cofactor for checkpoint kinase ATM, ATMIN.
<i>Bet1</i>	Downreg.	No	This gene encodes a golgi-associated membrane protein that participates in vesicular transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi complex.
<i>Casp4</i>	Downreg.	Yes	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase; sequential activation of caspases plays a central role in the execution phase of cell apoptosis.
<i>Coq10b</i>	Downreg.	No	Coenzyme Q10 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>).
<i>Creld2</i>	Downreg.	Yes	Cysteine-rich with EGF-like domains 2; the CRELD family has widely diverse biological roles in both developmental events and subsequent cell function.
<i>Ctgf</i>	Downreg.	No	The encoded protein plays a role in chondrocyte proliferation and differentiation, cell adhesion in many cell types, and is related to platelet-derived growth factor.
<i>Ddit3</i>	Downreg.	No	DNA-damage-inducible transcript 3; the protein is implicated in adipogenesis and erythropoiesis, is activated by endoplasmic reticulum stress, and promotes apoptosis.
<i>Derl3</i>	Downreg.	No	Der1-like domain family, member 3: this protein appears to be involved in the degradation of misfolded glycoproteins in the ER.
<i>Dnajb11</i>	Downreg.	No	DNAJB11 belongs to the evolutionarily conserved DNAJ/HSP40 family of proteins, which regulate molecular chaperone activity by stimulating ATPase activity.
<i>Dnajb9</i>	Downreg.	No	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9; this protein is induced by endoplasmic reticulum stress and plays a role in protecting stressed cells from apoptosis.
<i>Dnajc3</i>	Downreg.	No	It is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins and acts as an inhibitor of the interferon-induced, dsRNA-activated protein kinase (PKR).
<i>Dusp5</i>	Downreg.	Yes	It negatively regulates members of the mitogen-activated protein (MAP) kinase superfamily (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), which are associated with cellular proliferation and differentiation.
<i>Engase</i>	Downreg.	No	Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, (ENGase; EC 3.2.1.96) is involved in the processing of free oligosaccharides in the cytosol.
<i>Ero1lb</i>	Downreg.	No	ERO1-like beta (<i>S. cerevisiae</i>), endoplasmic oxidoreductin-1-like protein B.
<i>Etv5</i>	Downreg.	Yes	Ets variant gene 5; ETV5 belongs to the PEA3 subfamily of Ets transcription factors.
<i>Ggct</i>	Downreg.	No	Gamma-glutamylcyclotransferase; the encoded protein may also play a role in cell proliferation, and the expression of this gene is a potential marker for cancer.
<i>Gmppb</i>	Downreg.	No	GDP-mannose pyrophosphorylase B; catalyzes the conversion of mannose-1-phosphate and GTP to GDP-mannose, a reaction involved in the production of N-linked oligosaccharides.
<i>Hsp90b1</i>	Downreg.	No	Heat shock protein 90 kDa beta (Grp94), member 1; HSP90 proteins have key roles in signal transduction, protein folding, protein degradation, and morphologic evolution.
<i>Hspa5</i>	Downreg.	Yes	Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78 kDa); as this protein interacts with many ER proteins, it may play a key role in monitoring protein transport through the cell.
<i>Hyou1</i>	Downreg.	No	Hypoxia upregulated 1; the protein encoded by this gene belongs to the heat shock protein 70 family. This gene uses alternative transcription start sites.
<i>Igf2bp2</i>	Downreg.	No	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2; it functions by binding to the 5' UTR of the insulin-like growth factor 2 (IGF2) mRNA and regulating IGF2 translation.
<i>Il23a</i>	Downreg.	No	Interleukin 23, alpha subunit p19; both IL23 and IL12 can activate the transcription activator STAT4, and stimulate the production of interferon-gamma (IFNG).
<i>LOC365444</i>	Downreg.	No	Similar to CGI-09 protein.
<i>Manf</i>	Downreg.	No	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. Reducing expression of this gene increases susceptibility to ER stress-induced death and promotes cell proliferation.
<i>Mfsd2</i>	Downreg.	No	Major facilitator superfamily domain containing 2A. Mfsd2a plays a role in adaptive thermogenesis, it is a lung tumor suppressor gene that regulates cell cycle progression and matrix attachment.
<i>Nr4a2</i>	Downreg.	Yes	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2; this gene encodes a member of the steroid-thyroid hormone-retinoid receptor superfamily. The encoded protein may act as a transcription factor.
<i>Nupr1</i>	Downreg.	No	Nuclear protein, transcriptional regulator 1. It was originally identified as p8, a member of the family of HMG-I/Y transcription factors induced in response to various cellular stressors.
<i>Pdia4</i>	Downreg.	No	Protein disulfide isomerase family A, member 4.
<i>Riok3</i>	Downreg.	No	RIO kinase 3 (yeast); the specific function of this gene has not yet been determined.
<i>Sdf2l1</i>	Downreg.	No	Stromal cell-derived factor 2-like 1, a component of the endoplasmic reticulum chaperone complex.

Table 2. Cont.

Gene	Status	Selected for validation	Description
<i>Sec23b</i>	Downreg.	No	Sec23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>). The protein encoded by this gene is a member of the SEC23 subfamily of the SEC23/SEC24 family, which is involved in vesicle trafficking
<i>Sel1l</i>	Downreg.	No	Sel-1 suppressor of lin-12-like is part of a protein complex required for the retrotranslocation or dislocation of misfolded proteins.
<i>Tm4sf1</i>	Downreg.	Yes	Transmembrane 4 L six family member 1. The proteins mediate signal transduction events that play a role in the regulation of cell development, activation, growth and motility.
<i>Tmem66</i>	Downreg.	No	Transmembrane protein 66.
<i>Zfand2a</i>	Downreg.	No	Zinc finger, AN1-type domain 2A.
<i>Adamts9</i>	Upreg.	Yes	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9. Members of the ADAMTS family have been implicated in the cleavage of proteoglycans, organ development, and angiogenesis.
<i>Bcam</i>	Upreg.	No	Basal cell adhesion molecule, member of the immunoglobulin superfamily and a receptor for the extracellular matrix protein laminin.
<i>Cdh1</i>	Upreg.	Yes	Cadherin 1; the encoded protein is a calcium dependent cell-cell adhesion glycoprotein.
<i>Crip2</i>	Upreg.	Yes	Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2); acts as a repressor of NF-kappaB-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis.
<i>Duox2</i>	Upreg.	Yes	It is a glycoprotein and a member of the NADPH oxidase family; the synthesis of thyroid hormone is catalyzed by a protein complex located at the apical membrane of thyroid follicular cells.
<i>Dynlrb2</i>	Upreg.	No	Dynein light chain roadblock-type 2
<i>Elovl2</i>	Upreg.	No	ELOVL fatty acid elongase 2.
<i>Fgf18</i>	Upreg.	No	Fibroblast growth factor 18; involved in a variety of biological processes, including embryonic development, cell growth, morphogenesis, tissue repair, tumor growth, and invasion.
<i>Folr1</i>	Upreg.	No	This gene product is a secreted protein that either anchors to membranes via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage or exists in a soluble form.
<i>Krt20</i>	Upreg.	No	Keratin 20; the keratins are intermediate filament proteins responsible for the structural integrity of epithelial cells and are subdivided into cytokeratins and hair keratins.
<i>Prima1</i>	Upreg.	No	Proline-rich membrane anchor 1; the product of this gene functions to organize acetylcholinesterase (AChE) into tetramers, and to anchor AChE at neural cell membranes.
<i>Prss8</i>	Upreg.	No	Protease, serine, 8; this gene encodes a trypsinogen, which is a member of the trypsin family of serine proteases.
<i>Ril</i>	Upreg.	No	Reversion-induced LIM gene, binds alpha-actinin; may regulate actin stress fiber turnover.
<i>RT1-Da</i>	Upreg.	No	MHC class II RT1D alpha chain antigen.
<i>S100a4</i>	Upreg.	Yes	S100 calcium binding protein A4; S100 proteins are involved in the regulation of a number of cellular processes such as cell cycle progression and differentiation.
<i>Slit1</i>	Upreg.	No	Slit homolog 1; the genes encoding Slits and their Robo receptors are silenced in many types of cancer, including breast, suggesting a role for this signaling pathway in suppressing tumorigenesis.
<i>Tmem140</i>	Upreg.	No	Transmembrane protein 140.

doi:10.1371/journal.pone.0062849.t002

ratios of 22.8 and 3.6, respectively. We found binding of FoxE1 to chromatin regions containing the *Nis* upstream enhancer element (relative IP ratio: 12.6). We also observed positive FoxE1 binding to two DNA sites located in the *Duox2* gene; one in the promoter sequence at -351 bp (relative IP ratio: 28.1) and the other in the third exon at +696 bp (relative IP ratio: 9.3) (Figs 3 and 4). We did not detect direct FoxE1 interactions with either *Cdh1* or *Nr4a2*.

In order to better understand whether FoxE1 and NF1/CTF are bound together on the *Nis* and *Duox2* promoter regions, we performed ChIP assays using a polyclonal antibody against NF1. Next, we also performed ReChIP experiments with FoxE and NF1 antibodies. We quantified immunoprecipitated DNA regions using qPCR. The previously described FoxE1 binding sequence in the *Tg* promoter was used as positive control.

In our experimental conditions, we did not observe *in vivo* NF1/CTF binding to either of the two putative FoxE1 binding sequences in *Duox2* (data not shown). Nevertheless, we detected positive binding of NF1/CTF to the NUE. Moreover, we observed simultaneous FoxE1 and NF1/CTF binding to the NUE region.

Results of IP ratios normalised to the *Afm* negative control are shown in Fig. 5A. Similar results were obtained when *Gad1* was used as a negative control (data not shown).

As we wanted to study in depth the role of FoxE1 and NF1/CTF in *Nis* regulation, we cotransfected HeLa cells with FoxE1 and NF1/CTF expression vectors, together with a luciferase expression vector containing the NUE. Forty-eight hours later, cells were lysed and luciferase levels were measured. The results showed a significant 2-fold increase in the activity of NUE when FoxE1 or NF1/CTF were expressed individually in HeLa cells; thus, the effect was additive when both transcription factors were transfected together (Fig. 5B).

In summary, we present the first description of specific *in vivo* FoxE1 binding to regulatory regions of two relevant thyroid genes, *Nis* and *Duox2*. These FoxE1 core binding sequences are located close to a NF1/CTF transcription factor binding site. Moreover, we demonstrate that FoxE1 and NF1/CTF are simultaneously bound to the *Nis* upstream enhancer and that they cooperate in the regulation of *NIS*-promoter activity.

Table 3. Summary of FoxE1- NF1/CTF binding motif search.

Gene	Status	X bp	Strand	Sequence	% Sequence in orthologous	Average X bp in orthologous	Min X bp	Max X bp
<i>Tm4sf1</i>	Downreg.	29	-1	GGATGTTT-CTCACATCTACTACAGGGTTTCTGTTC-CCAAAGGA	70.6	23.5	6	29
<i>Env5</i>	Downreg.	29	1	TGATTGG-TCAATGGCGCCCAACGCATAAAATTATGTA-AAACAAGAC	50.0	20.3	11	29
<i>Hspa5</i>	Downreg.	10	1	GACTTGG-CAGAAAAGAA-AAACACTG	41.8	11.7	8	20
<i>Casp4</i>	Downreg.	8	-1	TTGTGTTT-GCTTGTTC-CCAAGAG	41.4	20.3	8	29
<i>RT1-Da</i>	Upreg.	11	-1	GTGTGTTT-TACCAACATT-CCAAACT	39.7	19.4	5	30
<i>Sel1l</i>	Downreg.	11	1	GGTTTGG-GAGAGCTGTTG-AAACATTT	38.6	13.6	5	29
<i>Ero1lb</i>	Downreg.	18	-1	GAGTGTTC-TACTACATGCTAGAAAG-CCAAGGC	35.6	18.2	6	29
<i>Elovl2</i>	Upreg.	26	-1	GTCGTGTT-AGACTGAATATTAGTGTCACATGCT-CCAAAGTG	35.4	15.1	7	26
<i>Nr4a2</i>	Downreg.	22	1	CTTTTGG-AATATCCGGAGGTAGACCCT-AAACAGCT	31.6	22.8	6	30
<i>Dnalb9</i>	Downreg.	18	1	TTTTTGG-CCTCAGTTTTCTAGGAG-AAACAGGG	31.5	16.6	5	29
<i>Manf</i>	Downreg.	24	1	AGATTGG-TTCGTCAATTCACGTGGTAGTTCA-AAACAAGA	31.4	15.9	5	30
<i>RT1-Da</i>	Upreg.	29	1	GCTTTGG-GGCTCAGTTTATTTTCCAGTGTCTCAGA-AAACAAGCA	29.3	17.5	7	30
<i>Bet1</i>	Downreg.	16	1	TAATTGG-ACCCCATGCTCCACCC-AAACAAGT	28.1	15.4	5	30
<i>Dynlrb2</i>	Upreg.	12	1	GGGTTGG-GGGGTGAGCAAC-AAACAAG	27.5	19.6	9	26
<i>Duox2</i>	Upreg.	26	1	TTCCTGG-AGCCCCGGGAGGGAGGAGAGAG-AAACAAGAA	26.6	19.8	7	28
<i>Crip</i>	Upreg.	27	1	GCCTTGG-CACCCCTCCCATGACCATGGAACAGG-AAACAACA	25.7	22.7	6	30
<i>Hsp90b1</i>	Downreg.	30	-1	CCCTGTTT-GCATCCGACCTGTGATAGTTAAGCGAGGC-CCAAAGTT	25.4	22.1	7	30
<i>Dnalj3</i>	Downreg.	21	1	ATCTTGG-GTGCAGCGGGGAGGAGTT-AAACATGG	24.1	19.6	7	29
<i>Sec23b</i>	Downreg.	6	1	TTTTTGG-ATGCT-AAACATGT	23.6	17.4	6	28
<i>Engase</i>	Downreg.	24	1	TGCTTGG-GGCTCATAAAGCTCAAGGCTGT-AAACAGTA	22.9	16.4	5	29
<i>Cdh1</i>	Upreg.	10	1	TACTTGG-GCTGGAAAC-AAACAAG	22.2	13.4	5	29
<i>Slit1</i>	Upreg.	28	-1	GAGTGTTC-CTTAATTTTCATCTATACTACTTAGC-CCAACTA	21.4	18.6	9	28
<i>Tmem140</i>	Upreg.	23	-1	TAGTGTTC-CTGGGAGCTGTCTACAGTCTTC-CCAAAGCT	21.1	15.8	6	26
<i>Crelid2</i>	Downreg.	28	-1	AAGTGTTC-ATCTGATGTAATGAGGCTACTTTGTAAG-CCAAAGA	18.5	21.6	10	30
<i>Duox2</i>	Upreg.	27	-1	CGGTGTTT-ATCAGGCTCTGCAGGAGCGCTACTCC-CCAAAGC	17.9	22.9	12	28
<i>Hyou1</i>	Downreg.	23	-1	AGGTGTTT-GACAGGTACAGTCTGTGTGTG-CCAAATTA	17.9	16.4	5	28
<i>Ctcf</i>	Downreg.	11	1	TTCCTGG-TGTTGTCTGG-AAACAAG	16.7	14.3	5	27
<i>Slit1</i>	Upreg.	23	1	ATCTTGG-AGGGTCATGATGGGATGATAGG-AAACAAG	15.9	15.9	5	26
<i>Tmem140</i>	Upreg.	29	1	GCCTTGG-GACACATTTTCTCAGAGGAGGAGGAG-AAAACAAA	15.6	23.5	11	29
<i>Ankrd37</i>	Downreg.	30	1	CAGTTGG-TATAAAGGCCATGTAAGAAATTTCCAGGAA-AAACATAC	15.0	21.3	7	30

Genes statistically significantly regulated by FoxE1, showing FoxE1-NF1/CTF binding motifs in their promoter regions (± 1000 bp). Status of their expression in the absence of FoxE1, sequence in their promoter regions containing the FoxE1-NF1/CTF motif, and base pair distance between NF1/CTF and FoxE1 motifs are detailed. Information regarding the presence of these motifs in their orthologous sequence is shown.
doi:10.1371/journal.pone.0062849.t003

A

NUE Nis

chr16:19043728-19044081

TTCCACAGACCGAGACATGGGTGCCGACACCGTGCCCGTGCGCACTCCATCCAGATCATGAAGGTGGAAGAGATTGCAGCT
GGCAAGTGCCGCCGGCCAGCTGTCAAGCAGTTCCACGTGAGTGAACCTGAGTGTGGGGCTGACGCAGGGCTGCAGGGGGTGG
TTGCGCATGGACAGTCCCTGGACATGCATCTCCTCCCTCCCCACAGGACTCCAAATGATCAAGTTCCTATTGCCCCACCGTGTG
TTGCGGCGCCAGCACAAACACGCTTCACCAACAAAGAGGCCAAACACCTTCTTCTAGACACAGAGACCCACTGAATAAAAAAC
TTCAGACTGTCTTGGTTGTTT

B

Duox2

chr3 109058760:109077706

AGGGGAGGTGTTCAAACCGGGTAGCAGGGTCTGTCTGGGTGAGATCATGCAAACGATGGGGCGGAGACATGCAAATAACGG
AAATCCCGTCCTTAACCTCGACGGTTAGCCTCTGATTACACATTTACACCTGCAGCGGTGGCGCGAGCTGACACCTGCGAGA
CTGCACGCAGAGAGGAGGGTGAAAGTGCATCCAGGAAGGTGAAGATTCCTGGAGCCCCCGGGCAGGGAGCGGAGAAGAGAAAC
AAAATCTCCAAGTACACGGAAGACTGTTGAACCCGAACCGGAGCATTACACCAGGTTCTCAGTTTATTAGCCTTCCCCCTC
TTCTATCCCCCTCTCTGAGAATCGGTATGTGGGAAATTGGGGTGAGAGTACCAGGTTTGTAGAACAAAGCCTCAGAGGCACTC
CTGCCCAGGATGTTTCAAGTGGTGAATCAGAACTCAGACGGGGTGGGGTAGGGGACTGTCTCGATACTTACCAGGTTGTC
CCAGAAAGCGCGTCATGAAGATGCGGGACTTGAGTAATATCTCTATGCTCCTCTCCAGGACCAACTGTGGGAGTGTGTGTC
CTCCCGCCCGGGGATCAAGGACAGCATGCTTCCAACAAGTCTCAAGACATTGGTGCTCCTGGGCGCTCTGTTGACTGGACC
CCTGGGTCCAGCAGGTAGGTAGTAAGAGCCTCTAGTTGAAAGGGTTCAGCTGGTGTCCCATGGGGGTGTGGAAAGGGAAAGG
TGCAGGCAGGTGGCACCTGGAAGCTGGAAGGGTTGATCCATTTCTTATGGGCTAGTGAAGTGAAGACTTCTCTGACTGCC
TGGGCCAGGCGAAAGGATTGGAATAGAGTTTATTGGCAGGAGTTAGCCAGCTGAGGAAGGAGTCTAAGCCATTAGGTCAT
GGAGGGGTTTCTGGAAGGTTAACGCTAAGTGAAGGCTCTCTGCCCCATAGGTGGCCAGGATGCACCTCACTGCCCTGGG
AAGTGCAGCGCTACGACGGCTGGTTTAATAATCTCAAGTACCACCAGCGCGGTGCAGCTGGTAAATCCTGGGTTCTGCGCAG
AGGAGGGCACGGAGTCGGAGTGGGGGAGAGGGCGCCAGCGGGATTACATTCTTACCACACTCTTATGCATTCTGGGTTAG
GAAATGGGGGCGGGAGGGGGGAACGTTGAGAGCTAAGAAAAACAGGTTTGTGCTTCTGGGGGACGGGGAGCCTTGATCCA
ACTCAACTCTCTGCACTCCCCAGGCTCGCAGCTGCGTCGCCAGTACCTGCTAATTACGCTGACGGTGTGTTATCAGGCTCTG
CAGGAGCCGCTACTCCCAAACGCTCGCCTGCTAAGCGACGCTGTCAGTAAGGGCAAAGC

■ FoxE1 binding sites ■ NF1/CTF binding sites □ Oligos used for amplification □ Pax8 binding sites (Ohno et al, 1999)

Figure 3. Putative FoxE1-NF1/CTF binding sites in the *Duox2* gene and in the NUE. Chromosomal location of putative FoxE1 and NF1/CTF binding motifs in the Nis upstream enhancer (panel A) and the *Duox2* gene (panel B). Oligos used and exons are represented in italics.
doi:10.1371/journal.pone.0062849.g003

Discussion

FoxE1 is a forkhead transcription factor essential for thyroid differentiation and function. In humans, *FOXE1* mutations cause the Bamforth-Lazarus syndrome (OMIM 241850) [9,10]. In spite of this, FoxE1 expression levels seem to be unaltered in human tumours. As reflected in the Gene Expression Omnibus database, *FOXE1* variations have been associated with susceptibility to several types of cancer [11,12,13], including papillary thyroid cancer [14,15,16]. FoxE1 recognizes and binds to the *Tg* and *Tpo* promoters. However, little is known about other downstream targets of FoxE1 that could explain the phenotypes observed in humans carrying variations in *FoxE1*. Only two studies reporting novel genes regulated by FoxE1 have been published until now [22,23], but both were done in a heterologous system overexpressing FoxE1. Our goal was to find new potential downstream mediators of FoxE1 function *in vivo*, but importantly, instead of a heterologous system we used a thyroid cell line. Results obtained by performing a genome-wide approach followed by chromatin immunoprecipitation analysis, led us to the identification of direct FoxE1 target genes in thyroid cells.

In this study, we found 54 putative novel FoxE1 target genes. We obtained a very restrictive list of significantly regulated genes, based on overlapping expression array data of two comparisons. This restrictive list did not allow us to obtain relevant information

about main pathways affected by FoxE1 action. We identified and validated eleven genes regulated by FoxE1; four of them (*Adams9*, *Cdh1*, *Duox2* and *S100a4*) showed an increased expression, whereas the remaining seven genes (*Casp4*, *Creld2*, *Dusp5*, *Etv5*, *Hsp5a*, *Nr4a2* and *Tm4sf1*) showed decreased mRNA levels when FoxE1 is silenced. Moreover, we have not ruled out that the other 43 statistically significant genes are true FoxE1 targets, and in future studies we will take advantage of these additional array results.

In order to identify genes directly regulated by FoxE1, we performed an *in silico* search of the FoxE1 binding motif in the promoter regions of 54 statistically significant genes. As the FoxE1 core binding sequence is very short, only five nucleotides, we were forced to perform a more restrictive search including the NF1/CTF binding sequence, as previously described for the *Tpo* promoter [21] and for other forkhead factors in the serum albumin gene promoter [34]. It has been proposed that the conserved interaction between NF1/CTF and forkhead proteins could reflect a general mechanism of action of both families of transcription factors. The NF1/CTF-binding site is masked inside the nucleosomal structure; binding of forkhead proteins to their cognate sites opens this structure and makes the NF1/CTF site accessible to exert its transactivation effect. The ability of the forkhead domain to induce DNA bending [36] would promote contact with NF1/CTF factors. It has been hypothesised that this

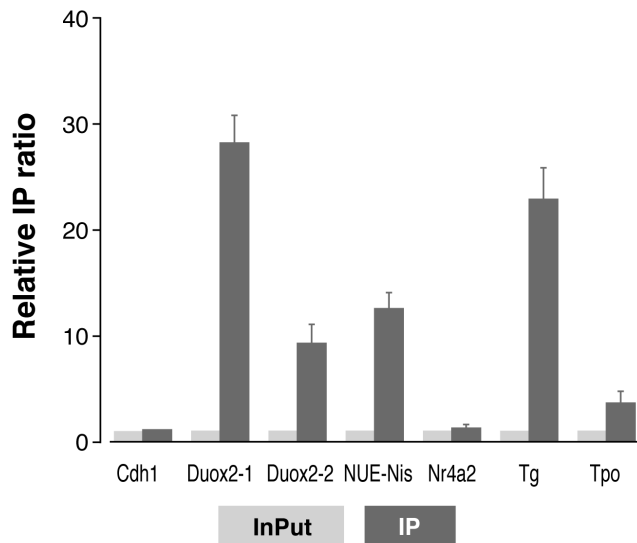


Figure 4. ChIP experiments for FoxE1 binding to selected genes. qPCR analysis of chromatin immunoprecipitation performed on PCC13 cells with FoxE1 antibody. The enrichment of target sequences was calculated as the IP ratio (arbitrary units) relative to the negative control Afm, and normalized to their relative amplification in the input sample. Sequences from the Tg and Tpo promoters were used as positive controls. Two regulatory regions were analysed in the *Duox2* promoter (called *Duox2-1* and *Duox2-2*). Results are mean \pm SEM of two independent experiments, each performed in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0062849.g004

interaction may play an important role in cell type-specific transcription and might be a widespread phenomenon [21].

Duox2 codes for the enzyme that catalyzes H_2O_2 production in the thyroid gland [37,38,39]. *Duox2* expression is found in the thyrocyte more abundantly than in several other cell types [40]. In humans, mutations in the corresponding gene are associated with congenital hypothyroidism [41,42]. *Duox2* regulation by the classical thyroid transcription factors Pax8 and Ttf1 has been studied in depth, however, two main studies reported controversial results [40,43]. Nevertheless, until now there were no indications in the literature of a role of FoxE1 in *Duox2* regulation.

In the present work we demonstrate that FoxE1 interacts *in vivo* with two DNA regions located in *Duox2*. We observed FoxE1 binding to the promoter region at -351 bp and to a second regulatory region located in exon 3 at $+696$ bp (Figs 3 and 4). However *Duox2* did not seem to be regulated by FoxE1 at the protein level, indicating the involvement of strong post-transcriptional regulatory mechanisms. Since *Duox2* mRNA expression increases when FoxE1 is silenced and since FoxE1 binds directly to two *Duox2* regulatory regions, we can hypothesise that FoxE1 is acting as a transcriptional repressor of *Duox2*.

The repressor function of FoxE1 has been previously reported. FoxE1 represses the transcriptional activity of Ttf1 and Pax8 during thyroid development through its C-terminal region, which contains an alanine-rich domain [3,19]. FoxE1 also inhibits estrogen receptor α transactivation through this domain [44]. In line with our hypothesis, a direct repression function that may require both target DNA binding and dimerization domains [45] has been demonstrated for other forkhead family members such as FoxP.

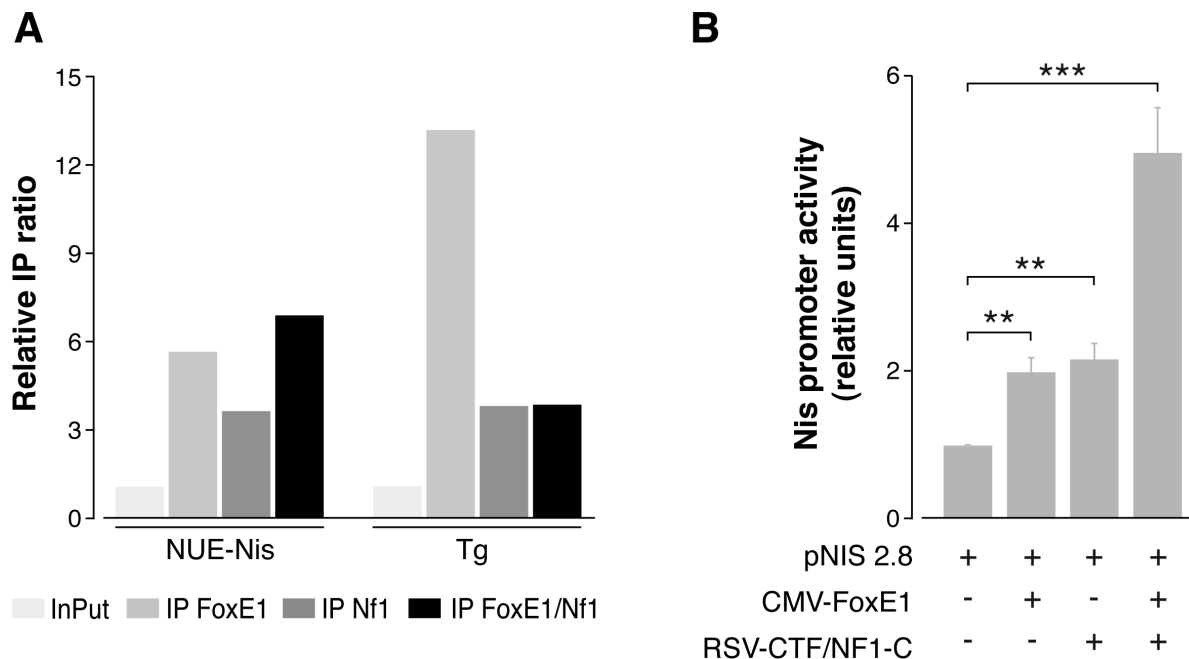


Figure 5. FoxE1 and NF1/CTF binding to and transcriptional activation of the NUE. A ReChIP assay was used to analyse simultaneous binding of FoxE1 and NF1/CTF proteins to the NUE (panel A). qPCR was done to analyse chromatin immunoprecipitates of PCC13 cells using FoxE1 and NF1 antibodies. The enrichment of target sequences was calculated as the IP ratio (arbitrary units) relative to the negative control Afm, and normalized to their relative amplification in the input sample. A sequence from the Tg promoter was used as positive control. HeLa cells were transfected with $1 \mu\text{g}$ of a FoxE1 or NF1/CTF expression vector or the empty vector, and $1.5 \mu\text{g}$ and $0.1 \mu\text{g}$ of pNIS 2.8-Luc and CMV-*Renilla* constructs respectively (panel B). Forty-eight hours after transfection, cells were collected for the measurement of luciferase and *renilla* levels. Results are shown as the mean \pm SD of the luciferase levels relative to the non-regulated *renilla* levels of six independent experiments. (*): $p < 0.05$; (**): $p < 0.01$; (***): $p < 0.001$; two tailed t-test. doi:10.1371/journal.pone.0062849.g005

FoxE1 binding domains in *Duox2* regulatory regions are localised at 26 and 27 bp from the NF1/CTF binding motif (Table 3). Nevertheless, in our experimental conditions, we were not able to detect direct *in vivo* binding of NF1/CTF to either of the two FoxE1 core sequences in *Duox2*. Thus, the exact FoxE1-mediated repression mechanism of *Duox2* expression remains to be elucidated.

Cdh1 belongs to a superfamily of glycoproteins that mediate calcium-dependent cell-cell adhesion. Cdh1 is highly expressed in the normal thyroid gland and its expression leads to aggregation of thyrocytes [46]. Moreover, thyroid-stimulating hormone (TSH) in dog and human thyroid cell cultures regulates *Cdh1* transcription [47], suggesting a relationship between *Cdh1* expression and thyroid differentiation. *FoxE1* expression itself is under TSH control [48]. Therefore it seems plausible that TSH, via FoxE1 and other players, might regulate expression levels of Cdh1. In fact, we observed an increased Cdh1 mRNA and protein expression when FoxE1 was silenced; nevertheless, we were not able to detect a direct interaction between FoxE1 and Cdh1.

Nr4a2 is a transcription factor that belongs to the steroid-thyroid hormone-retinoid receptor superfamily. In addition, Nr4a2 is a member of the NR4A subfamily of nuclear orphan receptors that function as ligand-independent early response genes involved in proliferation, apoptosis, and inflammation [49]. Nr4a2 cooperates with another member of the forkhead protein family, FoxA2, during dopamine neuron differentiation [50] and Nr4a2 overexpression enhances migration of mesenchymal stromal cells [49]. Our data reveals a downregulation of *Nr4a2* expression when FoxE1 is absent, but, in our experiments, FoxE1 did not directly bind to its promoter.

Further studies will be done to analyse in depth the apparently indirect regulation by FoxE1 of *Nr4a2* and *Cdh1* and its implication in cellular migration and/or thyroid differentiation.

Surprisingly, in the absence of FoxE, we observed both reduced *Nis* mRNA levels and reduced Nis protein levels (Fig. 2A and C). We found one FoxE1 core binding sequence and three NF1/CTF motifs in the NUE (Fig. 3A). NUE stimulates transcription in a thyroid-specific, cAMP-dependent manner and involves the most relevant aspect of *Nis* regulation. NUE contains Ttf1 binding sites that have no known effect on *Nis* transcription, Pax8 binding sites, and a degenerate cAMP responsive element sequence [35]. In their original study, Ohno *et al.* performed DNase I footprinting analysis of the NUE, but no footprints were detected when FoxE1 was used [35]. The first and foremost possibility that might explain the apparent discrepancy with our results is that Ohno *et al.* did *in vitro* experiments. In a later study, Li *et al.* suggested that FoxE1 participates in a human NIS repressor complex, together with PARP-1 [51]. Our study clearly demonstrates a direct *in vivo* interaction of FoxE1 with the NUE and a modification of *Nis* transcriptional activity in the absence of FoxE1. In addition, we observed direct NF1/CTF binding to the NUE, and we also demonstrated that FoxE1 and NF1/CTF are bound together on the NUE region. Binding of both transcription factors together resulted in an increased transcriptional activity of the NUE, confirming their cooperation in *Nis* regulation (Fig. 5).

Our work emphasizes the idea of a cross-talk of thyroid transcription factors during the process of transcriptional regulation, controlling key cellular processes for thyrocyte biology, with different roles of several players of this complex regulatory system that are still emerging.

On the one hand, a master thyroid gene, *Nis*, contains in its NUE binding sequences for Pax8, Ttf-1 and FoxE1-NF1/CTF

that appear to be linked in a complex network of reciprocal regulatory interactions. On the other hand, another of the best candidate genes in our genome-wide study is the thyroid gene *Duox2*; thus, evidence is accumulating regarding the existence of a regulatory network in the thyroid involving FoxE1.

Finally, our study points out the importance of cooperating transcription factors and the usefulness of previously used tools, especially the *in silico* search of transcription factor binding sequences. Core sequences are necessary but not sufficient, and flanking sequences determine transcription factor binding specificity [23,48]. The use of the FoxE1-NF1/CTF binding motif [21] led us to obtain a workable restrictive list of potential direct FoxE1 targets. Moreover, this opens a window to further investigating the cooperative function of FoxE1 and NF1/CTF in transcriptional regulation of our candidate genes, as we demonstrated to occur for *Nis* expression.

In search of potential downstream mediators of FoxE1 function, we identified *Nis* and *Duox2* as novel direct FoxE1 target genes. To our knowledge, this is the first evidence regarding the implication of *Nis* and *Duox2* in executing the transcriptional programme triggered by FoxE1. Both are pivotal proteins required for thyroid gland differentiation and function.

Although mainly acting as a regulator of the expression of the thyroid genes *Tg*, *Tpo*, *Nis* and *Duox2*, FoxE1 may also act in thyroid cells as a transcriptional regulator of many other candidate genes, some of which are suggested in the present study.

Supporting Information

Table S1 Oligonucleotides used for experimental validation of expression array data.

(DOC)

Table S2 Oligonucleotides used for ChIP analysis.

(DOC)

Table S3 Statistically significant probes (p<0.005) common to both comparisons (siFoxE1 PCCl3 vs siScrambl PCCl3, and siFoxE1 PCCl3 vs wt PCCl3).

(DOC)

Dataset S1 Microarray results for siFoxE1 PCCl3 vs siScramble PCCl3 comparison.

(XLS)

Dataset S2 Microarray results for siFoxE1 PCCl3 vs wt PCCl3 comparison.

(XLS)

Acknowledgments

We thank David G. Pisano and Enrique Carrillo de Santa Pau from the Bioinformatics Unit of the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO) for their contributions to microarray data analysis and Dr. Ronald Hartong for critical reading of the manuscript. We also thank Dr. Nancy Carrasco (Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA) and Dr. Corinne Dupuy (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) for the generous gifts of *Nis* and *Duox2* antibodies respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LPF PS. Performed the experiments: LPF AL-M. Analyzed the data: LPF AMM GG-L. Contributed reagents/materials/analysis tools: PS. Wrote the paper: LPF PS.

References

1. Damante G, Tell G, Di Lauro R (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 307–356.
2. De Felice M, Di Lauro R (2004) Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 25: 722–746.
3. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, et al. (1997) TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* 16: 3185–3197.
4. Myatt SS, Lam EW (2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 847–859.
5. Carlsson P, Mahlapuu M (2002) Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250: 1–23.
6. Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P (2007) The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol* 27: 7302–7314.
7. Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 25: 2227–2241.
8. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, et al. (1998) A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 19: 395–398.
9. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, Weaver CM, Harper PS (1989) Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet* 26: 49–51.
10. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, et al. (1998) Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 19: 399–401.
11. Venza I, Visalli M, Tripodo B, Lentini M, Teti D, et al. (2009) Investigation into FOXE1 genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 162: 681–683.
12. Venza I, Visalli M, Tripodo B, De Grazia G, Loddo S, et al. (2009) FOXE1 is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 162: 1093–1097.
13. Brune K, Hong SM, Li A, Yachida S, Abe T, et al. (2008) Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 3536–3542.
14. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, et al. (2009) Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* 41: 460–464.
15. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F, et al. (2009) The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* 5: e1000637.
16. Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, Tacon L, Sywak M, et al. (2012) Association of FOXE1 Polyalanine Repeat Region with Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E1814–1819.
17. Santisteban P, Acebron A, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R (1992) Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter. *Mol Endocrinol* 6: 1310–1317.
18. Aza-Blanc P, Di Lauro R, Santisteban P (1993) Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol Endocrinol* 7: 1297–1306.
19. Perrone L, Pasca di Magliano M, Zannini M, Di Lauro R (2000) The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 203–208.
20. Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R (1992) Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 12: 576–588.
21. Ortiz L, Aza-Blanc P, Zannini M, Cato AC, Santisteban P (1999) The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. *J Biol Chem* 274: 15213–15221.
22. Hishinuma A, Ohmika N, Namatame T, Ieiri T (2004) TTF-2 stimulates expression of 17 genes, including one novel thyroid-specific gene which might be involved in thyroid development. *Mol Cell Endocrinol* 221: 33–46.
23. Venza I, Visalli M, Parrillo L, De Felice M, Teti D, et al. (2010) MSX1 and TGF-beta3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1. *Hum Mol Genet* 20: 1016–1025.
24. Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, et al. (1987) One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7: 3365–3370.
25. Costamagna E, Garcia B, Santisteban P (2004) The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem* 279: 3439–3446.
26. Medina DL, Santisteban P (2000) Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* 143: 161–178.
27. Al-Shahrour F, Minguet P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, et al. (2007) FatGO+: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res* 35: W91–96.
28. Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, et al. (2010) Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 38: W210–213.
29. De la Vieja A, Reed MD, Ginter CS, Carrasco N (2007) Amino acid residues in transmembrane segment IX of the Na⁺/I⁻ symporter play a role in its Na⁺ dependence and are critical for transport activity. *J Biol Chem* 282: 25290–25298.
30. Dupuy C, Pomerance M, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Deme D, et al. (2000) Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 287–292.
31. Ruiz-Llorente S, Carrillo Santa de Pau E, Sastre-Perona A, Montero-Conde C, Gomez-Lopez G, et al. (2012) Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* 13: 147.
32. Garcia B, Santisteban P (2002) PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16: 342–352.
33. Nebl G, Cato AC (1995) NFI/X proteins: a class of NFI family of transcription factors with positive and negative regulatory domains. *Cell Mol Biol Res* 41: 85–95.
34. Jackson DA, Rowader KE, Stevens K, Jiang C, Milos P, et al. (1993) Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol Cell Biol* 13: 2401–2410.
35. Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R (1999) The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 19: 2051–2060.
36. Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P (1994) Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* 13: 5002–5012.
37. Bjorkman U, Ekholm R, Deneff JF (1981) Cytochemical localization of hydrogen peroxide in isolated thyroid follicles. *J Ultrastruct Res* 74: 105–115.
38. Bjorkman U, Ekholm R (1984) Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology* 115: 392–398.
39. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, et al. (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J Biol Chem* 274: 37265–37269.
40. Christophe-Hobertus C, Christophe D (2007) Human Thyroid Oxidases genes promoter activity in thyrocytes does not appear to be functionally dependent on Thyroid Transcription Factor-1 or Pax8. *Mol Cell Endocrinol* 264: 157–163.
41. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, et al. (2002) Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347: 95–102.
42. Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, et al. (2005) Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum Mutat* 26: 395.
43. D'Andrea B, Iacone R, Di Palma T, Nitsch R, Baratta MG, et al. (2006) Functional inactivation of the transcription factor Pax8 through oligomerization chain reaction. *Mol Endocrinol* 20: 1810–1824.
44. Park E, Gong EY, Romanelli MG, Lee K (2012) Suppression of estrogen receptor-alpha transactivation by thyroid transcription factor-2 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 421: 532–537.
45. Wang B, Lin D, Li C, Tucker P (2003) Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 forkhead transcriptional repressors. *J Biol Chem* 278: 24259–24268.
46. Yap AS, Stevenson BR, Keast JR, Manley SW (1995) Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation. *Endocrinology* 136: 4672–4680.
47. Brabant G, Hoang-Vu C, Behrendts J, Cetin Y, Potter E, et al. (1995) Regulation of the cell-cell adhesion protein, E-cadherin, in dog and human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 136: 3113–3119.
48. Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R, Santisteban P (1997) Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 272: 23334–23339.
49. Majenburgh MW, Gilissen C, Melief SM, Kleijer M, Weijer K, et al. (2011) Nuclear receptors Nur77 and Nur1 modulate mesenchymal stromal cell migration. *Stem Cells Dev* 21: 228–238.
50. Lee HS, Bae EJ, Yi SH, Shim JW, Jo AY, et al. (2010) Foxa2 and Nur1 synergistically yield A9 nigral dopamine neurons exhibiting improved differentiation, function, and cell survival. *Stem Cells* 28: 501–512.
51. Li W, Ain KB (2010) Human sodium-iodide symporter (hNIS) gene expression is inhibited by a trans-active transcriptional repressor, NIS-repressor, containing PARP-1 in thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 17: 383–398.

Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease

Lara P. Fernández, Arístides López-Márquez and Pilar Santisteban

Abstract | Identification of the thyroid transcription factors (TTFs), NKX2-1, FOXE1, PAX8 and HHEX, has considerably advanced our understanding of thyroid development, congenital thyroid disorders and thyroid cancer. The TTFs are fundamental to proper formation of the thyroid gland and for maintaining the functional differentiated state of the adult thyroid; however, they are not individually required for precursor cell commitment to a thyroid fate. Although knowledge of the mechanisms involved in thyroid development has increased, the full complement of genes involved in thyroid gland specification and the signals that trigger expression of the genes that encode the TTFs remain unknown. The mechanisms involved in thyroid organogenesis and differentiation have provided clues to identifying the genes that are involved in human congenital thyroid disorders and thyroid cancer. Mutations in the genes that encode the TTFs, as well as polymorphisms and epigenetic modifications, have been associated with thyroid pathologies. Here, we summarize the roles of the TTFs in thyroid development and the mechanisms by which they regulate expression of the genes involved in thyroid differentiation. We also address the implications of mutations in TTFs in thyroid diseases and in diseases not related to the thyroid gland.

Fernández, L. P. et al. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 29–42 (2015); published online 28 October 2014; doi:10.1038/nrendo.2014.186

Introduction

Thyroid tissue cells simultaneously express four genes that encode the transcription factors homeobox protein Nkx-2.1 (NKX2-1, also known as thyroid transcription factor 1; encoded by *NKX2-1*), forkhead box protein E1 (FOXE1, also known as thyroid transcription factor 2; encoded by *FOXE1*), paired box protein Pax8 (PAX8; encoded by *PAX8*) and haematopoietically-expressed homeobox protein Hhex (HHEX; encoded by *HHEX*), which are collectively known as the thyroid transcription factors (TTFs).^{1–3} Each of the TTFs is expressed in several other tissues in adult humans (Table 1), but they are only expressed together in epithelial thyroid follicular cells. These endoderm-derived cells are the most predominant cell type in thyroid tissue and are dedicated to the synthesis of thyroid hormones.⁴ Thyroid follicular cells are organized in follicular structures, which constitute the structural and functional units of the adult thyroid gland (which also contains a minority population of calcitonin-producing C-cells).^{1,2}

Although NKX2-1, FOXE1, PAX8 and HHEX are involved in thyroid differentiation, they belong to different families of transcription factors. NKX2-1 and HHEX are both members of the homeodomain family, FOXE1 is a forkhead domain protein and PAX8 is a paired domain family member (Table 1). These four transcription factors present a high degree of conservation across different species.⁵

Perturbations in levels of expression of the TTFs that result from mutations and/or epigenetic modifications

can lead to development of several clinically relevant conditions. Disruptions to thyroid morphogenesis in humans result in phenotypes—such as thyroid agenesis or athyreosis (complete absence of thyroid tissue), ectopia (thyroid displacement), hypoplasia (small thyroid) and hemiagenesis (presence of one-lobe thyroid)—that together are known as thyroid dysgenesis,^{6,7} which in some cases is accompanied by thyroid dysfunction.^{3,8,9} Findings from several studies suggest that defects in the functions of TTFs contribute to thyroid dysgenesis; however, the molecular pathways and mechanisms associated with these phenotypes remain unknown.¹

Normal developmental processes and cancers share multiple pathways that are related to cell proliferation and differentiation. Therefore, unsurprisingly, transcription factors that have a role in organogenesis have also been implicated in tumorigenesis. Changes in the expression of genes that encode TTFs and/or sequence variations in these genes have been associated with a number of thyroid and non-thyroid tumours, although the precise mechanisms that drive each of these processes are largely unknown.¹⁰ This Review summarizes current knowledge of the functions of TTFs in thyroid development, differentiation and pathogenesis, as well as their involvement in development of other organs, such as the lung and kidney, and their contribution to diseases not related to the thyroid gland.

TTFs

Over the past two decades, seminal work has led to the identification of TTFs and characterization of their functions in thyroid biology. In 1989, NKX2-1 was identified

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, and Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain (L.P.F., A.L.-M., P.S.).

Correspondence to: P.S. psantisteban@iib.uam.es

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Key points

- Homeobox protein *Nkx2.1* (*NKX2-1*), forkhead box protein *E1* (*FOXE1*), paired box protein *Pax8* (*PAX8*) and haematopoietically-expressed homeobox protein *Hhex* (*HHEX*) are transcriptional regulators of thyroid-specific genes
- NKX2-1* and *HHEX* are members of the homeodomain family, *FOXE1* is a forkhead domain protein and *PAX8* is a member of the paired domain family
- Simultaneous expression of the four thyroid transcription factors (TTFs) occurs exclusively in differentiated thyroid follicular cells and their precursors, and this expression pattern is a unique hallmark of thyroid tissue
- Alterations in expression of the TTFs that result from mutations, polymorphisms and/or epigenetic modifications can give rise to several pathologies including thyroid dysgenesis and thyroid cancer

as a thyroid-specific transcription factor in a differentiated rat thyroid cell line.¹¹ The gene encoding this transcription factor was independently cloned shortly thereafter by two groups, who termed this gene *Ttf1*¹² and *Tebp*.¹³ The human *NKX2-1* protein contains a 17-amino-acid motif that is conserved among *NK2.1* transcription factor family members, and the *NKX2-1* gene is expressed in the adult thyroid gland, as well as in lung tissue, basal ganglia neurons, cortical interneurons and the hypothalamus.^{14–16}

The *FOXE1* transcription factor was identified in the same study as *NKX2-1* and was originally termed TTF2.¹¹ In 1997, the genes *Ttf2*¹⁷ and *FKHL15*,¹⁸ which encode rat and human *FOXE1*, respectively, were identified. *FOXE1* is a single-exon gene encoding a 38–42 kDa protein, which contains a forkhead DNA-binding domain, two putative nuclear localization signals flanking the DNA-binding domain and a polyalanine stretch that ranges from 11 to 19 residues in length. *FOXE1* is a pioneer factor, as it has an intrinsic capacity to bind to and open chromatin structures via its winged-helix DNA-binding domain, which functions to facilitate binding of transcription factors to DNA.^{19,20} In humans, *FOXE1* is expressed in a number of tissues, including the thyroid gland, testis, epidermis and hair follicles.^{21–23} Additionally, *FOXE1* expression has been detected in

human thymus, brain, heart, pancreas, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, colon and small intestine.⁵

PAX8 was originally described in the developing excretory system and thyroid gland of mice.²⁴ As with other members of the paired domain family, *PAX8*, 48 kDa protein, contains two DNA-binding domains: a paired domain and a homeodomain.^{24,25} In addition to the thyroid gland, human *PAX8* is expressed in the renal excretory system, epithelial cells of the endocervix, endometrium, ovary, Fallopian tube and seminal vesicle, as well as in the epididymis, pancreatic islet cells and in lymphoid cells.^{26–28}

The *HHEX* gene is comprised of four exons and encodes a 30 kDa protein containing an evolutionarily conserved 60-amino-acid DNA-binding homeodomain. Although *HHEX* expression was first detected in human haematopoietic cells, the thyroid gland and the liver also express high levels of *HHEX*.^{29–32}

During mouse organogenesis, *Nkx2-1*, *Foxe1*, *Pax8* and *Hhex* are expressed in thyroid cell precursors.^{1,33} Expression of these genes persists in adult thyroid cells to establish and maintain the differentiated thyroid phenotype.^{1,33,34} The roles of *NKX2-1*, *FOXE1* and *PAX8* in binding to DNA and regulating genes that drive thyroid hormone synthesis, such as *Tg*, *Tpo*, *Slc5a5* and *Tshr*, have been extensively characterized.^{34–36} However, the number of studies that have addressed the capacity of *HHEX* to bind and regulate thyroid gene promoters is limited.³⁷

TTFs in thyroid gland development

At embryonic day (E)8.5 of mouse development, cells in the floor of the primitive pharynx coexpress *Nkx2-1*, *Pax8*, *Foxe1* and *Hhex*, driving commitment towards a differentiated thyroid fate. At E9.5, these committed cells form a bud, which expands and dissociates from the pharyngeal floor at E10.5–E11.5 and begins a caudal descent, ultimately forming two lobes on either side of the larynx and the upper trachea by E14.5.

Table 1 | General characteristics of thyroid transcription factors

Characteristic	<i>NKX2-1</i>	<i>FOXE1</i>	<i>PAX8</i>	<i>HHEX</i>
Human gene (mouse gene)	<i>NKX2-1</i> (<i>Nkx2-1</i>)	<i>FOXE1</i> (<i>Foxe1</i>)	<i>PAX8</i> (<i>Pax8</i>)	<i>HHEX</i> (<i>Hhex</i>)
Protein aliases	<i>NKX2A</i> , TTF1, TTF1, T/EBP	TTF2, TTF2, FKHL15	None	HEX, PRH, PRHX
Transcription factor family	Homeodomain	Forkhead domain	Paired domain	Homeodomain
Location	14q13.3	9q22.33	2q12-q14	10q23.33
Number of exons	3	1	12	4
Protein length (amino acids)	371	373	450	270
Protein weight (kDa)	38	38	48	30
Protein identity between human, mouse and rat (%)	98	89	95	95
Non-thyroid-tissue expression in adult	Lung, nervous system ^{14–16}	Testis, epidermis, hair follicles, thymus, brain, heart, pancreas, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, colon, small intestine ^{21–23,54}	Excretory system, endocervix, endometrium, ovary, Fallopian tube, seminal vesicle, epididymis, pancreatic islet cells, lymphoid cells ^{26–28}	Liver, haematopoietic cells ^{29–32}

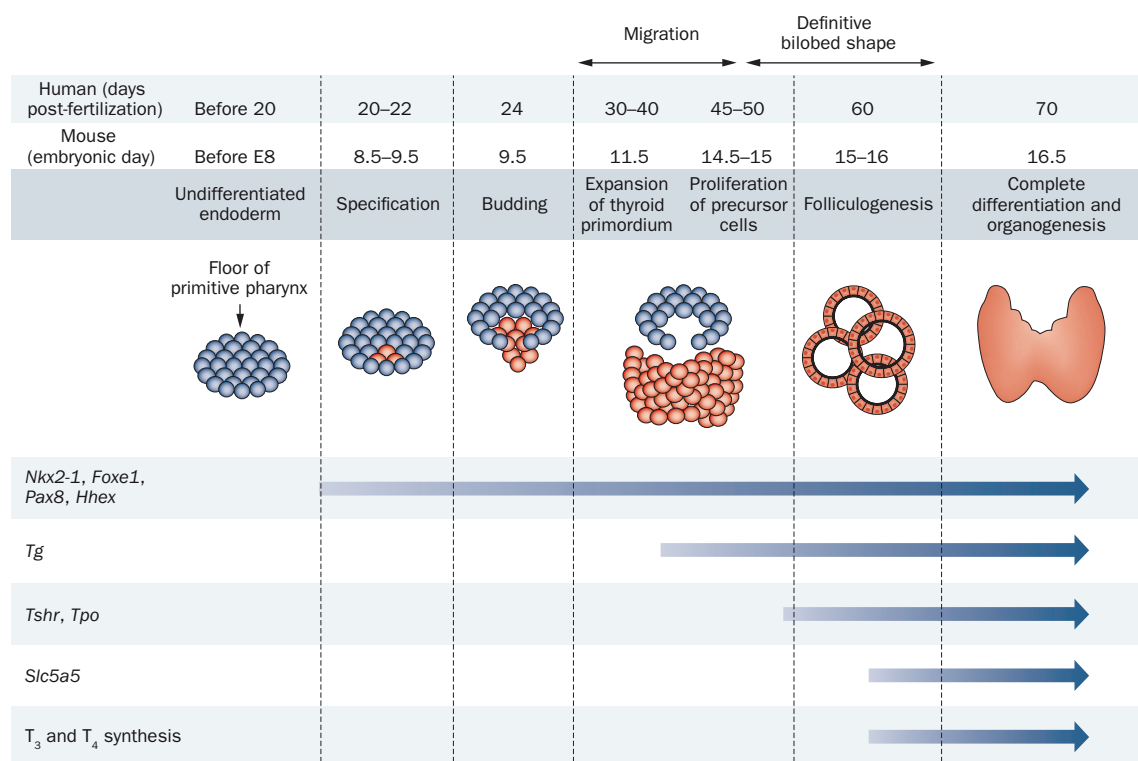


Figure 1 | Expression of thyroid transcription factors and the stages of thyroid development. The expression of *Nkx2-1*, *Foxe1*, *Pax8* and *Hhex* determine the specification of a group of cells from the ventral endoderm at E8.5–9.5 in mouse and at day 20–22 post-fertilization in humans. Bud formation takes place at E9.5 and day 24 post-fertilization, in mice and humans, respectively. From E11.5 in mice and day 30–40 post-fertilization in humans, the cells of the thyroid primordium begin to migrate downward to their final position in the trachea. At the same time as migration, the thyroid precursor cells proliferate and expand laterally, in a process known as lobulation, which is completed when the thyroid gland reaches its definitive position at E14.5–15 in mice and at day 45–50 post-fertilization in humans. At this time *Tg* is expressed in the primitive thyroid. However, expression of *Tpo* and *Tshr* is not activated until folliculogenesis begins at E16 and day 60 post-fertilization in mice and humans, respectively. At E16.5 in mice and day 70 post-fertilization in humans, the thyroid gland is completely formed and *Slc5a5* expression takes place. Synthesis of thyroid hormones T_3 and T_4 is initiated when the thyroid gland is completely functional.⁴⁸ Abbreviation: E, embryonic. Adapted with permission from Elsevier Limited © Macchia, P. E. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol. Med. Today* 6, 36–42 (2000).¹⁸⁹

At this time, the thyroid precursor cells have reached their definitive position and *Tg* expression is activated.³⁸ Folliculogenesis is complete at E16 and expression of *Tshr* and *Tpo* drives the final stages of functional differentiation, resulting in expression of sodium/iodide cotransporter (encoded by *Slc5a5*) and thyroid hormone biosynthesis at E16.5 (Figure 1).³ Small variations in the exact times of the expression of these proteins during thyroid gland development have been reported, and these are likely to be a result of the use of the term ‘embryonic day’ instead of the number of somites in a given study.^{38–40}

Several studies have examined the role of TTFs in mouse development (Table 2).^{1,33} Here, we will briefly review important aspects of the contributions of TTFs to thyroid development and highlight unanswered questions and controversial issues.

NKX2-1

During development NKX2-1 is expressed in multiple tissues and cell types in addition to the thyroid gland

(including the fourth branchial pouch, ultimobranchial body, lung, trachea, posterior pituitary, hypothalamus and medial ganglionic eminence, as well as the parathyroid and C-cells).^{41–43} *Nkx2-1*^{−/−} mice fail to survive after birth as a result of having severe lung malformations, thyroid and pituitary agenesis⁴³ and anomalies in the ventral forebrain.⁴⁴ Specification in *Nkx2-1*^{−/−} mice occurs normally and cells that comprise the primordial thyroid are present at E8.5. However, in these mice, degeneration of the primitive thyroid occurs at E12–13, possibly as a result of induction of apoptotic mechanisms that have yet to be studied in depth.^{45–48} Thus, it seems that during mouse organogenesis, NKX2-1 functions to maintain the survival of thyroid follicular cells, in addition to maintaining thyroid follicular structures⁴⁹ and contributing to dorsal–ventral patterning.^{47,50}

NKX2-1 is also crucial to lung development, which has been extensively reviewed elsewhere.⁵¹ Moreover, there is emerging interest in the role of NKX2-1 in nervous system development as a driver of numerous processes in interneurons (Table 2).^{52,53}

Table 2 | Phenotypes of mice in which TTF-encoding genes have been knocked out

TTF gene	Thyroid gland	Other tissues and organ systems
<i>Nkx2-1</i>	Complete absence of thyroid follicles ⁴³	Malformations in lung and pituitary glands ⁴³ Abnormalities in ventral forebrain ⁴⁴ No septation between trachea and esophagus ⁴⁷
<i>Foxe1</i>	Ectopy or agenesis of thyroid gland ⁵⁵	Cleft palate ⁵⁵
<i>Pax8</i>	Complete absence of thyroid follicles ⁵⁷	Infertility ⁵⁸
<i>Hhex</i>	No specification of thyroid precursors or thyroid agenesis at later stages ⁶⁴	Brain and liver malformations ⁶⁴

Abbreviation: TTF, thyroid transcription factor.

FOXE1

In addition to being expressed in the thyroid gland, FOXE1 is expressed during development of other tissues that are derived from the pharyngeal arches and pharyngeal wall, such as the tongue, palate and oesophagus, as well as in ectoderm-derived organs, such as anterior pituitary, choanae and hair follicles.⁵⁴ Although *Foxe1*-knockout mice are born alive, they fail to survive beyond 2 days post-birth as a result of having a severe cleft palate. These mice can develop with one of two thyroid phenotypes: either thyroid agenesis or thyroid ectopia (usually with a sublingual location of the thyroid). These differences in phenotypes have been proposed to be caused by stochastic events during organogenesis or by the variations in the genetic backgrounds of the mice (Table 2).^{1,55} Reintroduction of wild-type *Foxe1* exclusively into thyroid precursor cells of mice deprived of the endogenous gene restores proper gland positioning, which suggests that FOXE1 functions to regulate migration of these cells.⁵⁶ The expression pattern of FOXE1 throughout pharyngeal floor also suggests that this factor has a minor role in specification of thyroid follicular cell precursors.⁴⁸

PAX8

The TTF PAX8 is expressed in the developing thyroid gland, kidneys and myelencephalon.²⁴ The formation of the primordial thyroid and budding from the primitive pharynx occurs normally in *Pax8*^{-/-} mice.⁵⁷ However, at E11.5, the primitive thyroid in these mice is smaller than in normal mice, and at E12.5 thyroid follicular structures are absent from these animals. Consequently, *Pax8*^{-/-} mice have thyroid hypoplasia, low birth weight and growth retardation, infertility and only 20% of these animals survive up to 3 weeks of age owing to the effects of severe hypothyroidism.^{57,58} Treatment with levothyroxine increased length of survival of the mice, however, fertility was not recovered in male *Pax8*^{-/-} mice, as a result of a primary impairment in development of the reproductive system.⁵⁸ These phenotypes demonstrate that PAX8 is essential to survival of thyroid precursor cells in the later stages of thyroid development (Table 2).¹ Similar to NKX2-1, PAX8 might contribute to the maintenance of survival of thyroid precursor cells by inhibition of apoptotic mechanisms, as demonstrated

by *Pax8*^{-/-} mice expressing lower levels of the anti-apoptotic gene *Bcl2* in the thyroid bud at E10 than wild-type counterparts.⁵⁹ Furthermore, the proportion of apoptotic cells in the primitive thyroid of *Pax8*^{-/-} mice is increased.⁴⁰ Although PAX8 is expressed in tissues other than the thyroid, *Pax8*^{-/-} mice do not have defects in nervous system or kidney development. This seeming lack of phenotype might be due to the redundant activity of other Pax family proteins, such as PAX2 and PAX5, in these tissues.^{60,61} Interestingly, *Pax2*^{+/-};*Pax8*^{-/-} embryos fail to form a metanephros and other structures, such as ureter and genital tracts, as a result of defects in mesenchymal–epithelial transitions required for nephric duct formation.⁶² However, mice with either a *Pax2*^{+/-} or *Pax8*^{-/-} genotype alone do not have renal abnormalities.⁶² Furthermore, expression of *Hhex* and *Foxe1* genes is downregulated in the thyroid primordium of *Pax8*^{-/-} mice, demonstrating a role for PAX8 as regulator of expression of other TTFs during organogenesis and in maintenance of adult tissues.^{1,48,63}

HHEX

During embryogenesis, HHEX is expressed in the developing thyroid gland, as well as in the primitive thymus, liver, lungs and pancreas.^{31,32} Embryos of *Hhex*^{-/-} mice fail to survive beyond E15.5; the embryonic phenotype of these mice varies from severe to mild, according to the degree of malformation of organs such as the liver and brain. Severely affected embryos do not express *Foxe1* and *Nkx2-1* at E8.5 and these mice have thyroid agenesis in later developmental stages (Table 2). Although this phenotype might suggest that HHEX plays a critical part in thyroid specification, the general defects in the anterior endoderm of these mice, demonstrate that this developmental impairment is not thyroid-specific.⁶⁴ Conversely, embryos with moderate to mild malformations do show some degree of thyroid specification and develop a hypoplastic thyroid that remains connected to the pharynx.⁴⁸ At E9, mildly affected mice express normal levels of *Pax8*, *Foxe1* and *Nkx2.1*; however, by E10, *Pax8* and *Foxe1* expression is dramatically downregulated, which might account for the small and ectopic thyroid gland phenotype seen at E15.5.⁴⁸

These data demonstrate that HHEX is not required for either specification or budding of the primordial thyroid, but that this TTF regulates expression of *Pax8* and *Foxe1*, which control bud formation and survival of thyroid precursor cells in the later stages of thyroid development. The role of HHEX in thyroid organogenesis might be to regulate cell movement in the anterior foregut endoderm via a non-cell-autonomous mechanism, as has been described in liver.⁶⁵

Hierarchy of TTF expression

Although all four TTFs are expressed in thyroid precursor cells, the question of whether all of these factors are necessary to commit an undifferentiated cell to a thyroid fate has arisen. Experiments in mouse embryonic stem cells showed that transient expression of only *Pax8* and *Nkx2-1* is sufficient to drive differentiation of an epithelial

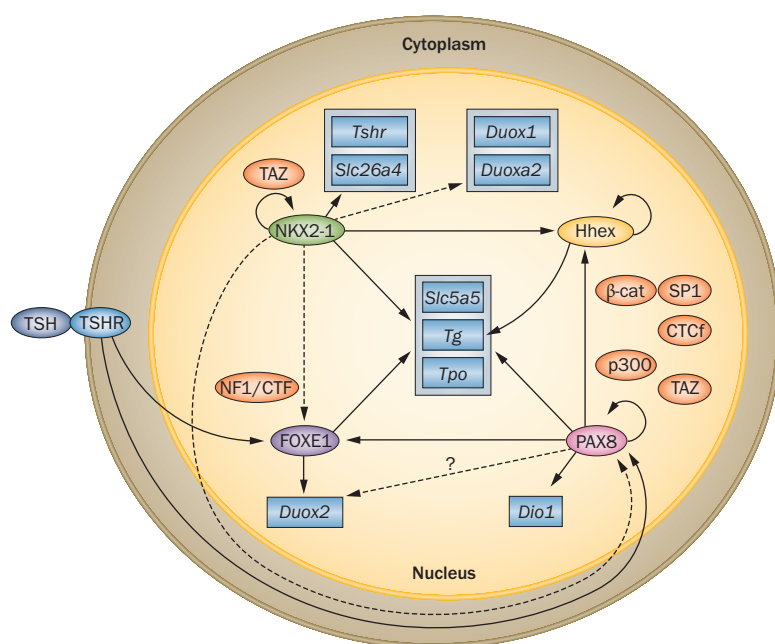


Figure 2 | TTFs in thyroid differentiation. The thyroid differentiation process is regulated by TSH, which binds to its membrane receptor, TSHR. All four TTFs regulate *Tg* transcription^{11,37,101} and NKX2-1, FOXE1 and PAX8 regulate *Slc5a5* and *Tpo* gene expression.^{13,35,71,74,98} NKX2-1 also regulates the expression of the other three TTFs, as well as of the thyroid-specific genes *Tshr*, *Slc26a4*, *Duox1* and *Duoxa2*.⁷⁷ NKX2-1 transcriptional activity can be modulated by the co-activator TAZ.⁷⁰ Expression of *Duox2* is regulated by FOXE1, which sometimes cooperates with NF1/CTF.⁹⁸ PAX8 regulation of *Foxe1*, *Hhex* and *Dio1* has been clearly demonstrated; however, its role in regulation of *Duox2* is controversial.^{80,109,110} Binding partners of PAX8 include TAZ, p300, CTCF, β-catenin and SP1.^{67,70,106–108} NKX2-1, PAX8 and HHEX also regulate their own expression.^{78,80,108,112} Solid arrows demonstrate known direct binding of TTFs to their target genes. Dotted arrows indicate interactions for which direct regulation has not been demonstrated. Cofactors and TTF-interacting proteins are shown in orange and target genes of TTFs are shown in blue. Abbreviations: β-cat, β-catenin; TTF, thyroid transcription factor.

thyroid lineage.⁶⁶ Additionally, overexpression of *Nkx2-1* in embryonic stem cells was sufficient to induce expression of *FoxE1*.⁶⁶ Studies in developing mice showed that in embryos at E10, *Hhex* expression was regulated by NKX2-1 and PAX8 and, as a part of an autoregulatory loop, HHEX controlled expression of *Pax8* and *Foxe1*.⁴⁸ Thus, expression of *Pax8* and *Nkx2-1* induces expression of *Hhex* and *Foxe1* in pluripotent cells, which drives thyroid differentiation.

These findings support a previous postulation that a hierarchy exists in the functional network of interactions between the TTFs.⁴⁸ At the very beginning of thyroid development (E8.5–9), expression of *Nkx2-1*, *Pax8* and *Hhex* is independent, as the absence of any one of these genes does not affect the expression of the others. By contrast, the expression of *Foxe1* is regulated by PAX8. The genes *Nkx2-1*, *Pax8* and *Hhex* are linked by reciprocal regulatory interactions. At E10, each of the transcription factors encoded by these three genes influences the expression of the genes that encode the other TTFs, and together these proteins control the expression of *Foxe1*, which is downstream in the thyroid regulatory network.⁴⁸

Of note, the primordial thyroid forms normally in all TTF-mutant mice, which suggests that each of these transcription factors is not individually necessary for development of this structure, but that they are required for the emergence and survival of the thyroid bud (Figure 1).^{43,55,57,64} Thus, the transcription factors upstream of *Nkx2-1*, *Pax8*, *Foxe1* and *Hhex* will need to be identified to fully understand the initial events that control thyroid specification in thyroid progenitor cells.³³ Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells will provide important tools for identifying these upstream factors and other contributors to thyroid development.

TTFs in the differentiated thyroid

Differentiated thyroid follicular cells express proteins that are critical for biosynthesis, storage and secretion of the thyroid hormones T_3 and T_4 .¹ These proteins include thyroglobulin (TG), thyroid peroxidase (TPO), sodium/iodide cotransporter (SLC5A5, also known as NIS), thyrotropin receptor (TSHR), dual oxidase 1 and 2 (DUOX1 and DUOX2, respectively), solute carrier family 26 member 4 (SLC26A4, also known as pendrin), iodo-tyrosine dehalogenase 1 (IYD-1) and monocarboxylate transporter 8 (MCT8). TTFs regulate the expression of genes that encode several of these proteins; thus, the coordinated expression of TTFs is essential for maintaining the function of the differentiated thyroid (Figure 2).^{36,48} The actions of NKX2-1, FOXE1, PAX8 and HHEX in thyroid differentiation have been extensively studied; however, few investigations have addressed the identification of the genomic targets of the TTFs in the differentiated thyroid. Emerging research using genomic approaches has provided some insight into the functions of TTFs in mature thyroid tissues. For example, genomic targets of PAX8 (such as enhancers, silencers and boundary elements) that potentially regulate transcription of downstream genes in a differentiated thyroid cell line have been described.⁶⁷

NKX2-1

The gene that encodes thyroglobulin (*Tg*) was the first identified transcriptional target of NKX2-1,^{11,68,69} which interacts with co-activators, such as WWTR1 (also known as TAZ),⁷⁰ at the *Tg* promoter to regulate expression. Other genes regulated by NKX2-1 in the adult rodent thyroid include *Tpo*, *Tshr*, *Slc5a5*, *Hhex* and *Slc26a4*.^{13,71–76} Microarray analysis of thyroid cells has revealed both known and new putative NKX2-1 target genes, including the genes that encode the other TTFs, *Foxe1*, *Pax8* and *Hhex*, as well as *Duox1*, *Duoxa1*, *Cdh1*, *Vim* and genes encoding proteins involved in cell cycle arrest (Figure 2).⁷⁷ Moreover, NKX2-1 regulates its own expression via an autoregulatory loop that is driven by the presence of NKX2-1 binding sequences in the promoter of the *Nkx2-1* gene (Figure 2).^{78–80}

The NKX2-1 core binding site is CAAG (Figure 3),^{11,12,81} which shares elements with the consensus binding nucleotide sequence T(T/C)AAGTG(G/C) of the NK-2 homeodomain family.⁸² Additionally, a genomic analysis in a human lung cancer cell line identified the motif sequence c/gTg/tGAGa/tGg/c as the most significant

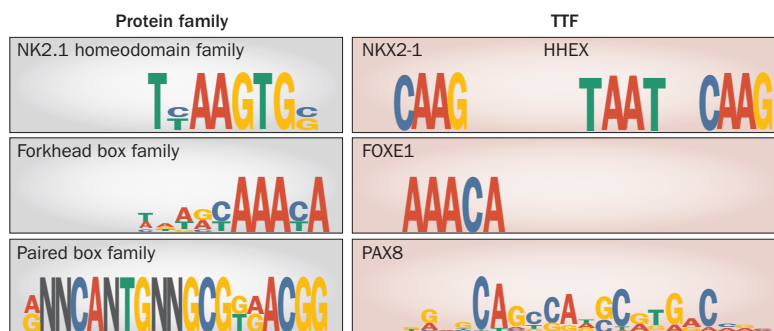


Figure 3 | Consensus binding motifs of TTFs. Known binding motifs of TTFs and the protein families to which they belong. The core binding motif for PAX8 was determined by ChIP-seq analysis in differentiated rat thyroid cell lines; NKX2-1, FOXE1 and HHEX binding sequences were defined by individual gene-based approaches in thyroid cell systems.^{11,12,37,67,71,101} Abbreviations: ChIP-seq, chromatin immunoprecipitation sequencing; TTF, thyroid transcription factor.

sequence to which NKX2-1 was bound.⁸³ In lung tissues, NKX2-1 regulates the expression of several lung-specific genes including *SFTPA1*, *SFTPB*, *SFTPC* (which code for surfactant proteins) and *SCGB1A1* (encoding Clara-cells specific 10-kD protein), as well as *ABCA3*, *BMP4* and *MYBPH*.^{84–86} The study of novel NKX2-1 targets in lung cancer is also emerging; and, in these tissues, *OCN*, *E2F3*, *CCNB1*, *CCNB2*, *MET* and *LMO3* are among the genes regulated by NKX2-1.^{83,87,88} Several other NKX2-1 target genes have been reported in other systems, for example *RET* in Hirschsprung disease,⁸⁹ *Sparc* and *Hcrtr2* in mouse neurons,^{90,91} and *Nes* in mouse forebrain development (Figure 4).⁹²

FOXE1

Maintenance of the differentiated thyroid is reliant on expression of *Foxe1*,¹ which mediates TSH-driven expression of the *Tg* and *Tpo* genes (Figure 2).^{93–95} The promoter regions of both these FOXE1 target genes contain the AAACA core (Figure 3),⁷¹ where FOXE1 generally functions as a transcriptional activator, although it can also act as a transcriptional repressor.⁹⁶ Additionally, FOXE1 can bind with the transcription factor nuclear factor 1 (also known as NF1/CTF) to form a complex that regulates *Tpo* expression in response to external hormonal stimuli, such as TSH and insulin-like growth factor 1, in adult rat thyroid cells.^{19,97} A genomic analysis performed in a rat thyroid follicular cell line identified two thyroid-specific genes, *Duox2* and *Slc5a5*, as novel direct FOXE1–NF1/CTF targets (Figure 2).⁹⁸ Other genes, such as *Cdh1* and *Nr4a2*, were also identified as transcriptional targets of FOXE1 (Figures 2 and 4).⁹⁸ Furthermore, in an established human kidney cell line, novel FOXE1 target genes, such as *MSX1* and *TGFB3*, have been identified (Figure 4).^{99,100} Together, these results expand upon the classical FOXE1-associated functions and provide new insights about FOXE1 transcriptional networks in differentiated thyroid cells.

PAX8

PAX8 is the master regulator of the differentiated thyroid phenotype,⁶³ and is required in thyroid cells

for transcriptional activation of *Tg*, *Tpo*, and *Slc5a5* (Figure 2).^{35,101} Initial analyses performed in a rat thyroid follicular cell line revealed a PAX8 core binding sequence of eight nucleotides (TGCCCAg/cT) at the *Tg* and *Tpo* promoters.¹⁰¹ Next-generation sequencing approaches in thyroid cells have extended these findings and the PAX8 consensus binding motif has since been redefined to GNNCAGCCATGCGTGACCN (Figure 3).^{35,67,101–104} The PAX8 core binding sequence overlaps with the NKX2-1 binding sequence in the *Tg* and *Tpo* promoters,¹⁰¹ and PAX8 synergizes with NKX2-1 to drive transcriptional activation of the *Tg* gene.¹⁰⁵ Other PAX8 binding partners have been described: PAX8 cooperates with TAZ⁷⁰ to regulate expression of *Tg*; with histone acetyltransferase p300 to mediate *Tg* and *Tpo* transcription;^{106,107} and with CTCF, SP1 and β -catenin at the *Slc5a5* promoter.^{67,108}

PAX8 has been demonstrated to regulate expression of *Hhex*¹⁰⁹ and *Foxe1*.^{80,110} Regulation of other thyroid-specific genes, for example *Dio1*⁶⁷ and *Duox2*, by PAX8 has also been reported; however, the reports regarding the contribution of PAX8 to transcriptional regulation of *Duox2* are conflicting.^{80,111} Finally, similar to *Nkx2-1*, *Pax8* expression is also autoregulated owing to the presence of PAX8 binding sites in the regulatory regions of the *Pax8* promoter (Figure 2).^{108,112}

Given that PAX8 is considered a master regulator transcription factor, it is possible that it regulates expression of genes other than thyroid-specific genes. In fact, several well-known tumour suppressor genes, including *TP53*¹¹³ and *WT1*,¹¹⁴ have been identified as transcriptional targets of PAX8 in human astrocytoma cells and in an *in vitro* system, respectively. Furthermore, findings from studies using whole-genome sequencing have expanded knowledge of PAX8 functions in thyroid cancer and thyroid biology with the identification of several target genes involved in carcinogenesis (*Brca1*), thyroid malignancies (phosphatidylinositol/insulin and MAPK pathways) and cell-cycle processes (*Cdkn2B*, *Ccnb1* and *Ccnb2*, among others).⁶⁷ PAX8 has been shown to preferentially bind in non-promoter CpG-rich genomic regions, and direct involvement of PAX8 in the regulation of genes involved in cell proliferation and differentiation (*Cited2*, *Taz*, *Runx2*, *Trib1*), signal transduction (*Wnt4*), apoptosis, cell polarity and transport (*Myo5b*, *Rab17*, *Kcnj16*), cell motility and adhesion (*Rab11a*, *Rab8a*, *Ncam* and *Cdh16*) and a plethora of DNA–protein-related processes has been described.⁶⁷ PAX8 has also been shown to be involved in tumour cell proliferation through regulation of *E2F1*,¹¹⁵ as well as in proliferation and apoptosis of differentiated thyroid epithelial cells via direct transcriptional regulation of *TP53inp1*¹¹⁶ and *Bcl2* (Figure 4).⁵⁹

HHEX

The role of HHEX in the adult thyroid and its function as a transcriptional regulator of genes that encode thyroid differentiation markers is poorly understood. In thyroid cells, HHEX represses transcription of *Tg* by inhibiting the activating effects of PAX8 and NKX2-1 via binding to the core DNA sequences 5'-TAAT-3' or 5'-CAAG-3' in the *Tg* promoter (Figure 3).³⁷ Interestingly, however,

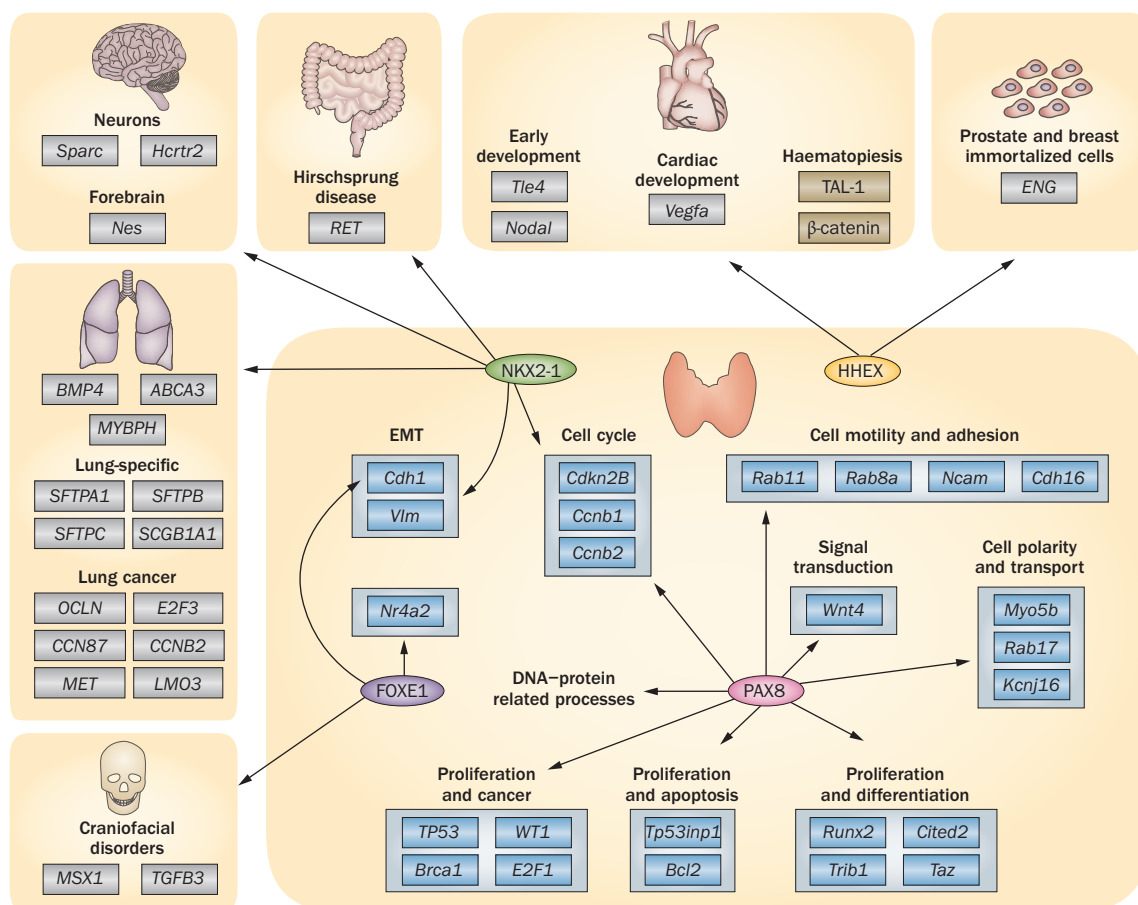


Figure 4 | Novel TTF target genes. Putative TTF-regulated genes have been identified in genomic studies in the thyroid gland, as well as in other systems. NKX2-1 regulates genes involved in the cell cycle and EMT in thyroid cells,⁷⁷ as well as a number of genes in healthy lung and lung cancer tissues,^{83–88} neurons, forebrain and in Hirschsprung disease.^{89–92} FOXE1 regulates *Cdh1* and *Nr4a2* in thyroid cells;⁹⁸ and *MSX1* and *TGFB3* have emerged as FOXE1 targets related to craniofacial disorders.¹⁰⁰ PAX8 regulates a wide variety of genes and pathways, including proliferation, apoptosis, differentiation and cell motility and adhesion, among others.^{67,110} Novel functions and target genes of HHEX have been analysed in development^{117–119} and in immortalized prostate cells,¹²⁰ but not in thyroid systems. TTF target genes in thyroid cells are shown in blue; TTF target genes in other systems are shown in grey; TTF binding partners are shown in brown. Abbreviations: EMT, epithelial–mesenchymal transition; TTF, thyroid transcription factor.

HHEX positively regulates the transcription of its own gene via an autoregulatory loop similar to that of NKX2-1 and PAX8.^{75,78–80}

In contrast to the few studies that have addressed the role of HHEX in differentiated thyroid cells, the functions of HHEX as regulator of development processes is well characterized. For example, HHEX regulates *Vegfa* expression in cardiac development;¹¹⁷ interacts with the transcription factor TAL-1 during haematopoiesis in zebrafish;¹¹⁸ and regulates expression of *Tle4* and *nodal* in early development, together with β-catenin.¹¹⁹ In immortalized prostate and breast cell lines, HHEX was shown to directly regulate transcription of *ENG* and influence cell migration.¹²⁰

Mutations in TTFs

Thyroid pathologies are common among endocrine diseases and range from severe congenital disorders to different types of highly aggressive tumours. Given the important role of TTFs in development, cell proliferation

and differentiation, it is unsurprising that mutations in the genes that encode these proteins are also associated with thyroid disorders.

Thyroid dysgenesis

The anatomical position of the thyroid gland is determined by a complex signalling network, and disruptions in this pathway can result in a spectrum of malformations that are collectively termed thyroid dysgenesis.¹²¹ Many of the phenotypes of animal models in which either *Nkx2-1*, *FoxE1*, *Pax8* or *Hhex* have been knocked out (Table 2) accurately reflect the phenotypes of congenital thyroid disorders in human patients (Table 3). Among these disorders, primary congenital hypothyroidism is highly prevalent, with an incidence of ~1 per 3,500 newborn individuals.^{5,6} Congenital hypothyroidism can be consequent to disruptions in thyroid hormone biosynthesis (a condition known as dyshormonogenesis), but in many cases results from thyroid dysgenesis.⁸ The spectrum of phenotypes included within human thyroid

Table 3 | Human phenotypes and syndromes associated with mutations in TTF-encoding genes

TTF gene	Mutation location	Phenotype	Disease
<i>NKX2-1</i>	Homeobox or region encoding the transactivation domain	Normal thyroid, thyroid agenesis, athyreosis, hypoplasia, hemiagenesis and/or benign hereditary chorea and respiratory distress ^{126–129}	Brain–lung–thyroid syndrome ¹³⁰
<i>FOXE1</i>	Forkhead box	Thyroid hypoplasia, athyreosis and/or cleft palate, choanal atresia, bifid epiglottis, spiky hair and tongue-tie ¹³⁴	Bamforth–Lazarus syndrome ²¹
	Polymorphisms determining the length of the polyalanine tract	Thyroid ectopia ^{136,137} and hemiagenesis ¹³⁸	Thyroid dysgenesis
<i>PAX8</i>	Paired box, region encoding the transactivation domain, or promoter region	Thyroid hypoplasia, athyreosis, thyroid ectopia ¹⁴⁵ and, rarely, unilateral kidney ¹⁴⁷ and problems in urogenital tract ¹⁴⁶	Congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis ¹²⁶
<i>HHEX</i>	No mutations identified in humans	None	None

Abbreviation: TTF, thyroid transcription factor.

dysgenesis comprises thyroid agenesis or athyreosis, ectopia, orthotopic hypoplasia and hemiagenesis.^{1,122} Although these pathologies mainly occur as sporadic diseases, in some cases an inherited basis to development of a thyroid disorder exists. Mutations in *NKX2-1*, *FOXE1* and *PAX8*, as well as polymorphisms in *FOXE1*, are associated with thyroid dysgenesis in humans.^{1,122} Additionally, epigenetic modifications have been suggested to contribute to these pathologies.^{123–125}

In humans, mutations in *HHEX* have not yet been described; however, findings that placentas of *Hhex*^{−/−} mice are affected and embryos of these mice fail to survive beyond early embryogenesis⁶⁴ suggest that mutations in this gene are embryonically lethal.

NKX2-1

A number of different mutations (missense, nonsense, frameshift, splice-site) and deletions in the *NKX2-1* gene, either in the homeobox or in the sequence encoding the transactivation domains of the *NKX2-1* protein, have been described in patients with thyroid dysgenesis (Table 3). The thyroid phenotypes are variable and range from normal to agenesis, athyreosis, hypoplasia and hemiagenesis of the gland.^{126–128} However, as *NKX2-1* is also expressed in lung and the ventral diencephalon, thyroid dysgenesis in patients with an affected *NKX2-1* gene is usually also associated with brain and/or lung manifestations. Brain–lung–thyroid syndrome is characterized by congenital hypothyroidism, respiratory distress and benign hereditary chorea (a movement disorder); however, all three major phenotypes are not always present in a given individual and the severity of each phenotype can vary.^{129–131} All patients with *NKX2-1* mutations have a neurological phenotype; however, only a portion of these individuals have concomitant thyroid and/or lung disease, possibly as a result of certain mutations in *NKX2-1* having a deleterious effect in lung development.¹²⁸ Most mutations in *NKX2-1* result in haploinsufficiency, but a few mutations result in generation of a protein that has a dominant-negative effect on wild-type *NKX2-1*.^{126,132,133} Notably, the most prevalent cause of brain–lung–thyroid syndrome is the existence of mutations in *NKX2-1*,¹²⁷ which is why routine screening for mutations in this gene

is recommended for patients who present with benign hereditary chorea alone or together with congenital hypothyroidism and/or lung problems.

FOXE1

Despite intensive research, only a few mutations have been described so far in *FOXE1*, many of which are in the forkhead domain, resulting in a protein that has partially or completely lost its capacity to bind DNA and that is consequently unable to activate transcription.¹³⁴ Interestingly, however, an emerging study has identified a novel gain-of-function mutation in *FOXE1* in a patient with Bamforth–Lazarus syndrome.¹³⁵

The *FOXE1* phenotypes are not restricted exclusively to the thyroid gland and mutations are often associated with craniofacial alterations. For example, the first homozygous missense mutation identified in the *FOXE1* gene was seen in two brothers with Bamforth–Lazarus syndrome, who presented with athyreosis, cleft palate, spiky hair, bilateral choanal atresia and a bifid epiglottis.²⁰

The major thyroid phenotypes associated with mutations in *FOXE1* are athyreosis and/or hypoplasia but never ectopia (as has been described in *Foxe1*^{−/−} mice).^{55,134} However, a few cases of ectopic thyroid gland have been described in individuals with polymorphisms that affect the length of the polyalanine tract of the *FOXE1* protein. Analysis of the region encoding the polyalanine tract provided the first evidence that *FOXE1* might be a susceptibility gene involved in thyroid dysgenesis. Analysis of different haplotype distributions in patients with athyreosis, thyroid ectopy and hemiagenesis showed an association between homozygous mutations in the *FOXE1* gene that resulted in an alanine tract length of either 14 or 16 residues and risk of thyroid dysgenesis.^{136–138} These polymorphisms were exclusively associated with thyroid phenotypes and suggest that even in the absence of mutations, polymorphisms in *FOXE1* can influence the thyroid gland development. The function of the polyalanine tract in *FOXE1* is not known; however, changes in the length of the alanine stretch in other transcription factors can result in either a loss or a gain of function and have been associated with several congenital malformation syndromes.¹³⁹

PAX8

A number of *PAX8* mutations have been found in patients with thyroid dysgenesis, most of which are localized to the paired box domain, with only a few in the region encoding the transactivation domain^{1,122} and three in the promoter region.^{140–142} These mutations can affect different functions of the protein, such as DNA binding, gene activation,^{141–143} protein stability¹⁴⁴ and cooperation with the co-activator p300.¹⁰⁶ Affected individuals have heterozygous *PAX8* autosomal dominant mutations,¹⁴⁵ although in mice both alleles must be affected to produce a congenital hypothyroidism phenotype.⁵⁷ The thyroid phenotypes seen in patients are mainly thyroid gland hypoplasia and, to a lesser extent, athyreosis and ectopy. The phenotype of individuals with *PAX8* mutations is usually restricted to the thyroid gland and is characterized by congenital hypothyroidism as a result of dysgenesis. Nevertheless, associations with unilateral kidney agenesis and abnormalities in the urogenital tract have been described.^{146,147}

Epigenetic factors and noncoding regions

In all cases of thyroid dysgenesis, mutations in the genes that encode the TTFs have variable penetrance, supporting the notion that thyroid dysgenesis is a complex disease and suggesting that additional genetic elements might contribute to the wide spectrum of observed phenotypes. The effects of TTFs can be modulated by other, as yet unidentified, factors as this disease has a multigenic origin.¹⁴⁸ In fact, the molecular aetiology of most patients with thyroid dysgenesis remains unclear as mutations in TTFs have been identified in only a few cases and discrepancies exist between observed genotypes and phenotypes.

Thus, new mutations that contribute to thyroid dysgenesis should be sought in introns and regulatory regions, such as the 3' untranslated region, where microRNAs (miRNAs) bind, in addition to the coding regions of genes. Supporting a role for miRNAs in thyroid biology, inactivation of the miRNA-processing enzyme, Dicer, leads to severe hypothyroidism in mice.^{149,150} Moreover, many of the genes downstream of the TTFs that ultimately control thyroid organogenesis are still unknown, and it is possible that mutations in one or more of these genes are involved in thyroid dysgenesis. In this respect, next-generation sequencing and other genomic approaches are promising technologies, as studies using these tools have already identified new target genes of TTFs.^{67,77,98,110}

Finally, the discordance for thyroid dysgenesis in monozygotic twins also supports a role for the involvement of epigenetic mechanisms in these disorders.^{1,151} Transcriptome, methylome and genomic variations in ectopic thyroid glands have been reported, and although the molecular underpinnings of the variations could not be defined, these results offer new possibilities for determining the causes of defective thyroid migration.¹²⁵ Indeed, an emerging study has reported tissue-dependent differential methylation of the *FOXE1* promoter and identified two consecutive

CpG dinucleotides in the promoter that act as epigenetic modifiers of *FOXE1* expression.¹⁵²

Associations with thyroid cancer

Thyroid cancer is the most frequently occurring neoplasia of endocrine organs,¹⁵³ and over 90% of thyroid tumours arise from follicular thyroid cells. Follicular-cell-derived tumours can be subclassified into three groups: well-differentiated carcinomas (including papillary thyroid carcinoma [PTC], which accounts for around 85% of cases, and follicular thyroid carcinoma [FTC], which represents ~5–10% of cases); poorly differentiated carcinomas (2%); and anaplastic or undifferentiated carcinomas (ATC), which represent the most infrequently occurring thyroid neoplasias. Patients with well-differentiated follicular carcinomas generally have a better prognosis than patients with poorly differentiated carcinomas or ATC.¹⁵⁴

NKX2-1

In lung cancer, expression levels of *NKX2-1* have been widely studied and are used as a diagnostic and prognostic factor.^{155–158} Either absent expression or amplified *NKX2-1* levels of expression are indicative of a worse prognosis than normal expression levels.¹⁵⁸ Nevertheless, no mutations in *NKX2-1* have been found in lung adenocarcinomas.⁹ Interestingly, opposing functions for *NKX2-1* in tumours—oncogenic or tumour-suppressive—have been described, which constitutes the as yet unresolved *NKX2-1* paradox.^{159,160} The dual roles of this transcription factor might be explained by different cell contexts in which *NKX2-1* interacts with either co-activators or co-repressors to regulate the expression of oncogenes and/or tumour suppressor genes; however, this explanation is speculative and remains to be substantiated.

Although the role of *NKX2-1* as a tumour suppressor in thyroid cancer has not been studied in detail, *NKX2-1* expression decreases with increasing dedifferentiation states in thyroid cancers, with anaplastic tumours having very low levels of *NKX2-1* expression (Table 4).^{161–163} Furthermore, a single nucleotide polymorphism (SNP) at 14q13.3, a genomic region close to the *NKX2-1* gene, has been associated with PTC and FTC;¹⁶⁴ and a germline g.1016C>T missense mutation that leads to the Ala339Val mutation in the transactivation domain of *NKX2-1* has been found in PTC and in multinodular goitre patients.¹⁶⁵ Finally, *NKX2-1* rearrangements have also been described in T-cell acute lymphoblastic leukaemia.¹⁶⁶

FOXE1

The role of *FOXE1* as a susceptibility gene for thyroid cancer has been extensively characterized (Table 4). Several association studies have been performed and the findings replicated, revealing two SNPs that are clearly associated with PTC and FTC in multiple populations.^{164,167} Both rs955113 and rs1867277 are located in the same disequilibrium block (meaning that these alleles co-occur on the same haplotype more often than is expected by chance), and are situated 57 kbp and 238 bp

Table 4 | Expression patterns and genetic alterations of TTFs in thyroid cancer

TTF	Thyroid cancer			Other cancers (alterations)
	Protein expression levels or localization	Genetic alterations	Predisposition	
NKX2-1	PTC > FTC > anaplastic ^{161–163}	rs944289 ¹⁶⁴ Missense germline mutation g1016C>T (Ala339Val) ¹⁶⁵	PTC and FTC PTC	Increased expression in lung adenocarcinomas and small-cell carcinomas ¹⁵⁸ Amplifications but no mutations detected ⁹
FOXE1	PTC > FTC > anaplastic ^{169,170}	rs95513 ¹⁶⁴ rs1867277 ¹⁶⁷	PTC	Loss of heterozygosity, promoter methylation and presence of 16-alanine stretch allele in SCC ¹⁷³
PAX8	Conflicting reports (either PTC > FTC > anaplastic, ¹⁶¹ or Pax8 is expressed in a high proportion of anaplastic carcinomas ¹⁶⁹)	PAX8–PPARG ^{180,181,185} Epistasis with <i>STK17B</i>	FTC	Increased expression in neoplastic renal tissues, ¹⁷⁷ Wilms tumour, ²⁷ Müllerian carcinoma ¹⁷⁹ and ovarian cancer ²⁸
HHEX	PTC, FTC and anaplastic (anaplastic expression mislocalised in cytoplasm) ¹⁸⁶	None	None	Loss of nuclear localization ¹⁸⁶ and/or loss of functional HHEX in AML and CML ¹⁸⁷

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; FTC, follicular thyroid cancer; PTC, papillary thyroid cancer; SCC, squamous cell carcinoma; TTF, thyroid transcription factor.

upstream of the *FOXE1* transcription start site, respectively. Additionally, rs955113 has been associated with radiation-induced PTC.¹⁶⁸ When rs1867277 is present, binding of the transcription factors upstream stimulatory factor 1 and upstream stimulatory factor 2 to the *FOXE1* promoter in thyroid cells is increased, supporting the hypothesis that increased binding of these factors leads to increased *FOXE1* expression and confers a motile advantage to cancer cells.¹⁶⁷ Moreover, *FOXE1* expression follows the same pattern as *NKX2-1* expression, and shows an inverse correlation with dedifferentiation, with anaplastic tumours having low levels of *FOXE1* expression.^{169,170} An additional study demonstrated that a gradient of levels of *FOXE1* expression in PTC tumour borders correlates with *FOXE1* mislocalization in the cytoplasm, unless the *FOXE1* SNP rs1867277 is present.¹⁷¹

Alterations in *FOXE1* such as loss of heterozygosity at the *FOXE1* chromosomal area,¹⁷² *FOXE1* promoter methylation¹⁷³ and the presence of a rare variant of *FOXE1*, which results in a modified alanine tract length,¹⁷⁴ have been also associated with development of squamous cell carcinoma. Moreover, methylation of the *FOXE1* promoter has been linked to pancreatic and breast cancers.^{175,176}

PAX8

Expression of PAX8 is increased in neoplastic renal tissues, Wilms tumours, ovarian cancer and Müllerian carcinomas.^{27,28,169,177–179} However, in thyroid cancers, the pattern of PAX8 expression remains unclear and two studies have reported conflicting results. One study described an expression pattern similar to that of *NKX2-1* and *FOXE1* expression,¹⁶¹ however, another research group proposed that PAX8, but not *NKX2-1*, could be a good anaplastic carcinoma marker.¹⁶⁹ The *PAX8–PPARG* fusion gene is widely accepted to be an early follicular-thyroid-carcinoma-specific oncogene.^{180,181} The *PAX8–PPARγ* fusion protein has been found in ~36% of FTCs, 16% of the follicular variant

of PTCs, ~11% of the follicular adenomas and 2% of Hürthle cell carcinomas.^{182–184} Expression of a fusion protein that contains the PAX8 DNA binding domain has been hypothesized to increase cell-cycle transition, reduce apoptosis and enhance cell growth.¹⁸¹ Finally, an epistatic interaction between *PAX8* and *STK17B* (a gene encoding a serine-threonine kinase involved in apoptosis regulation) has been reported, further expanding known PAX8 functions (Table 4).¹⁸⁵

HHEX

HHEX is expressed in anaplastic carcinomas; however, the protein is mislocalized in the cytoplasm (Table 4).¹⁸⁶ This aberrant localization might represent a mechanism by which the nuclear functions of HHEX are regulated. The HHEX transcription factor contains a homeo-domain, and it has been proposed that several, as yet unknown, HHEX functions might be related to cytoplasmic signal transduction through this domain, as has been described for engrailed proteins.¹⁸⁶ Loss of nuclear location and/or loss of functional HHEX has been associated with acute myeloid leukaemia, chronic myeloid leukaemia and breast cancers.^{186–188}

Conclusions

Simultaneous expression of the four TTFs, *NKX2-1*, *FOXE1*, *PAX8* and *HHEX*, is essential for the proper development of the thyroid gland and for maintaining the functional differentiated state of the adult thyroid. Divergent roles of TTFs have been described in the thyroid differentiation programme, as well as in cell proliferation and apoptosis. Importantly, TTF-regulated targets and functions are not restricted to genes in the thyroid gland, revealing new and fascinating perspectives to understanding the role of each of the TTFs in other tissues.

Numerous studies indicate that TTFs are not individually required for the specification of thyroid precursor cells. Nevertheless, signals involved in the induction

of expression of the TTFs remain unidentified. In particular, signals derived from cardiogenic mesoderm might have critical functions in thyroid development and need to be studied in depth. The molecular pathways and mechanisms that connect TTFs to thyroid dysgenesis and thyroid cancer are largely unknown and require further study. The study of the involvement of TTFs in non-thyroid tumours is also of particular interest. Emerging genomic analyses have provided some clues, but additional studies are needed. Functional analyses of susceptibility, the contribution of miRNAs,

stem cells and of differential gene expression patterns within tumours and between tumour subtypes are of utmost importance.

Review criteria

A PubMed search of articles published between 1981 and 2014 was done. Keywords included "Nkx2-1", "Ttf1", "FoxE1", "Ttf2", "Pax8", "Hhex", "thyroid", "development", "differentiation", "hypothyroidism", "thyroid dysgenesis" and "thyroid cancer".

- De Felice, M. & Di Lauro, R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr. Rev.* **25**, 722–746 (2004).
- Santisteban, P. & Bernal, J. Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **6**, 217–228 (2005).
- Fagman, H. & Nilsson, M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 35–54 (2010).
- Grapin-Botton, A. & Melton, D. A. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet.* **16**, 124–130 (2000).
- Flieck, P. et al. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* **42**, D749–D755 (2014).
- Fisher, D. A. & Klein, A. H. Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. *N. Engl. J. Med.* **304**, 702–712 (1981).
- Gruters, A. & Krude, H. Detection and treatment of congenital hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 104–113 (2011).
- Park, S. M. & Chatterjee, V. K. Genetics of congenital hypothyroidism. *J. Med. Genet.* **42**, 379–389 (2005).
- Van Vliet, G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin. Genet.* **63**, 445–455 (2003).
- Kimura, S. Thyroid-specific transcription factors and their roles in thyroid cancer. *J. Thyroid Res.* **2011**, 710213 (2011).
- Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A. J. & Di Lauro, R. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J.* **8**, 2537–2542 (1989).
- Guazzi, S. et al. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J.* **9**, 3631–3639 (1990).
- Mizuno, K., Gonzalez, F. J. & Kimura, S. Thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP): cDNA cloning, functional characterization, and structural identity with thyroid transcription factor TTF-1. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4927–4933 (1991).
- Ikeda, K. et al. Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 8108–8114 (1995).
- Hamdan, H. et al. Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**, 336–348 (1998).
- Nakamura, K. et al. Immunohistochemical analyses of thyroid-specific enhancer-binding protein in the fetal and adult rat hypothalamic and pituitary glands. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **130**, 159–166 (2001).
- Zannini, M. et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J.* **16**, 3185–3197 (1997).
- Chadwick, B. P., Obermayr, F. & Frischauf, A. M. *FKHL15*, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. *Genomics* **41**, 390–396 (1997).
- Cuesta, I., Zaret, K. S. & Santisteban, P. The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7302–7314 (2007).
- Zaret, K. S. & Carroll, J. S. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* **25**, 2227–2241 (2011).
- Clifton-Bligh, R. J. et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat. Genet.* **19**, 399–401 (1998).
- Sequeira, M. et al. Production and application of polyclonal antibody to human thyroid transcription factor 2 reveals thyroid transcription factor 2 protein expression in adult thyroid and hair follicles and prepubertal testis. *Thyroid* **13**, 927–932 (2003).
- Eichberger, T. et al. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1180–1187 (2004).
- Plachov, D. et al. *Pax8*, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* **110**, 643–651 (1990).
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. & Noll, M. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene *paired* and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* **47**, 1033–1040 (1986).
- Ozcan, A., Liles, N., Coffey, D., Shen, S. S. & Truong, L. D. PAX2 and PAX8 expression in primary and metastatic Müllerian epithelial tumors: a comprehensive comparison. *Am. J. Surg. Pathol.* **35**, 1837–1847 (2011).
- Poleev, A. et al. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development* **116**, 611–623 (1992).
- Riesco-Eizaguirre, G. et al. NIS mediates iodide uptake in the female reproductive tract and is a poor prognostic factor in ovarian cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E1199–E1208 (2014).
- Crompton, M. R. et al. Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5661–5667 (1992).
- Bedford, F. K., Ashworth, A., Enver, T. & Wiedemann, L. M. *HEX*: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1245–1249 (1993).
- Thomas, P. Q., Brown, A. & Beddington, R. S. *Hex*: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* **125**, 85–94 (1998).
- Bogue, C. W., Ganea, G. R., Sturm, E., Ianucci, R. & Jacobs, H. C. *Hex* expression suggests a role in the development and function of organs derived from foregut endoderm. *Dev. Dyn.* **219**, 84–89 (2000).
- De Felice, M. & Di Lauro, R. Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. *Endocrinology* **152**, 2948–2956 (2011).
- Damante, G. & Di Lauro, R. Thyroid-specific gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 255–266 (1994).
- Ohno, M., Zannini, M., Levy, O., Carrasco, N. & di Lauro, R. The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2051–2060 (1999).
- Damante, G., Tell, G. & Di Lauro, R. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **66**, 307–356 (2001).
- Pellizzari, L. et al. Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2503–2511 (2000).
- Postiglione, M. P. et al. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 15462–15467 (2002).
- Davies, T. F., Latif, R., Minsky, N. C. & Ma, R. Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 2692–2702 (2011).
- Fagman, H. & Nilsson, M. Morphogenetics of early thyroid development. *J. Mol. Endocrinol.* **46**, R33–R42 (2011).
- Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M. & Di Lauro, R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**, 1093–1104 (1991).
- Suzuki, K., Kobayashi, Y., Katoh, R., Kohn, L. D. & Kawaoi, A. Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells. *Endocrinology* **139**, 3014–3017 (1998).
- Kimura, S. et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* **10**, 60–69 (1996).
- Nobrega-Pereira, S. et al. Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* **59**, 733–745 (2008).
- Tanaka, H. et al. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development

- regulator TTF-1. *Cancer Res.* **67**, 6007–6011 (2007).
46. Kimura, S., Ward, J. M. & Minoo, P. Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie* **81**, 321–327 (1999).
47. Minoo, P., Su, G., Drum, H., Bringas, P. & Kimura, S. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *Nkx2.1*($-/-$) mouse embryos. *Dev. Biol.* **209**, 60–71 (1999).
48. Parlato, R. et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev. Biol.* **276**, 464–475 (2004).
49. Kusakabe, T. et al. Thyroid-specific enhancer-binding protein/NKX2.1 is required for the maintenance of ordered architecture and function of the differentiated thyroid. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1796–1809 (2006).
50. Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. & Rubenstein, J. L. Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359–3370 (1999).
51. Herriges, M. & Morrissey, E. E. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* **141**, 502–513 (2014).
52. Du, T., Xu, Q., Ocbina, P. J. & Anderson, S. A. NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by activating *Lhx6*. *Development* **135**, 1559–1567 (2008).
53. Butt, S. J. et al. The requirement of *Nkx2.1* in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* **59**, 722–732 (2008).
54. Dathan, N., Parlato, R., Rosica, A., De Felice, M. & Di Lauro, R. Distribution of the *tf2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev. Dyn.* **224**, 450–456 (2002).
55. De Felice, M. et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat. Genet.* **19**, 395–398 (1998).
56. Fagman, H., Andersson, L. & Nilsson, M. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev. Dyn.* **235**, 444–455 (2006).
57. Mansouri, A., Chowdhury, K. & Gruss, P. Follicular cells of the thyroid gland require *Pax8* gene function. *Nat. Genet.* **19**, 87–90 (1998).
58. Wistuba, J. et al. Male congenital hypothyroid *Pax8* $^{-/-}$ mice are infertile despite adequate treatment with thyroid hormone. *J. Endocrinol.* **192**, 99–109 (2007).
59. Fagman, H. et al. Gene expression profiling at early organogenesis reveals both common and diverse mechanisms in foregut patterning. *Dev. Biol.* **359**, 163–175 (2011).
60. Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O. & Gruss, P. *Pax2*, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* **109**, 787–795 (1990).
61. Asano, M. & Gruss, P. *Pax-5* is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech. Dev.* **39**, 29–39 (1992).
62. Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubuser, A. & Busslinger, M. Nephric lineage specification by *Pax2* and *Pax8*. *Genes Dev.* **16**, 2958–2970 (2002).
63. Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R. & Zannini, M. *Pax8* has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 13144–13149 (2000).
64. Martinez Barbera, J. P. et al. The homeobox gene *Hex* is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**, 2433–2445 (2000).
65. Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera, J. P. & Zaret, K. S. *Hex* homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev. Biol.* **290**, 44–56 (2006).
66. Antonica, F. et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* **491**, 66–71 (2012).
67. Ruiz-Llorente, S. et al. Genome-wide analysis of *Pax8* binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* **13**, 147 (2012).
68. Sinclair, A. J., Lonigro, R., Civitareale, D., Ghibelli, L. & Di Lauro, R. The tissue-specific expression of the thyroglobulin gene requires interaction between thyroid-specific and ubiquitous factors. *Eur. J. Biochem.* **193**, 311–318 (1990).
69. De Felice, M., Damante, G., Zannini, M., Francis-Lang, H. & Di Lauro, R. Redundant domains contribute to the transcriptional activity of the thyroid transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 26649–26656 (1995).
70. Di Palma, T. et al. TAZ is a coactivator for *Pax8* and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation. *Exp. Cell Res.* **315**, 162–175 (2009).
71. Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. & Di Lauro, R. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 576–588 (1992).
72. Civitareale, D., Castelli, M. P., Falasca, P. & Saiardi, A. Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1589–1595 (1993).
73. Shimura, Y., Shimura, H., Ohmori, M., Ikuyama, S. & Kohn, L. D. Identification of a novel insulin-responsive element in the rat thyrotropin receptor promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 31908–31914 (1994).
74. Endo, T. et al. Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na^+/I^- symporter gene. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1747–1755 (1997).
75. Puppini, C. et al. Thyroid-specific transcription factors control *Hex* promoter activity. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1845–1852 (2003).
76. Dentice, M. et al. *Pendrin* is a novel *in vivo* downstream target gene of the TTF-1/NKx-2.1 homeodomain transcription factor in differentiated thyroid cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10171–10182 (2005).
77. Christophe-Hobertus, C., Lefort, A., Libert, F. & Christophe, D. Functional inactivation of thyroid transcription factor-1 in PCC13 thyroid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **358**, 36–45 (2012).
78. Oguchi, H. & Kimura, S. Multiple transcripts encoded by the thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP)/thyroid-specific transcription factor-1 (TTF-1) gene: evidence of autoregulation. *Endocrinology* **139**, 1999–2006 (1998).
79. Nakazato, M., Endo, T., Saito, T., Harii, N. & Onaya, T. Transcription of the thyroid transcription factor-1 (TTF-1) gene from a newly defined start site: positive regulation by TTF-1 in the thyroid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 748–752 (1997).
80. D'Andrea, B. et al. Functional inactivation of the transcription factor *Pax8* through oligomerization chain reaction. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1810–1824 (2006).
81. Damante, G. et al. Sequence-specific DNA recognition by the thyroid transcription factor-1 homeodomain. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3075–3083 (1994).
82. Wang, L. H., Chmelik, R. & Nirenberg, M. Sequence-specific DNA binding by the vnd/NK-2 homeodomain of *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 12721–12726 (2002).
83. Watanabe, H. et al. Integrated cis- and trans- expression analysis of amplified NKX2-1 in lung adenocarcinoma identifies LMO3 as a functional transcriptional target. *Genes Dev.* **27**, 197–210 (2013).
84. Boggaram, V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKx2.1/TTF1) gene regulation in the lung. *Clin. Sci. (Lond.)* **116**, 27–35 (2009).
85. Hosono, Y. et al. MYBP, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis. *EMBO J.* **31**, 481–493 (2012).
86. Zhu, N. L., Li, C., Xiao, J. & Minoo, P. NKX2.1 regulates transcription of the gene for human bone morphogenetic protein-4 in lung epithelial cells. *Gene* **327**, 25–36 (2004).
87. Runkle, E. A. et al. Occludin is a direct target of thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2-1). *J. Biol. Chem.* **287**, 28790–28801 (2012).
88. Tagne, J. B. et al. Genome-wide analyses of *Nkx2.1* binding to transcriptional target genes uncover novel regulatory patterns conserved in lung development and tumors. *PLoS ONE* **7**, e29907 (2012).
89. Leon, T. Y. et al. Transcriptional regulation of *RET* by *Nkx2.1*, *Phox2b*, *Sox10*, and *Pax3*. *J. Pediatr. Surg.* **44**, 1904–1912 (2009).
90. Provenzano, C., Pascucci, B., Lupari, E. & Civitareale, D. Large scale analysis of transcription factor TTF-1/NKX2.1 target genes in GnRH secreting cell line GT1-7. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 215–223 (2010).
91. Satoh, A. et al. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of *Nk2 homeobox 1* in the DMH and LH. *Cell Metab.* **18**, 416–430 (2013).
92. Pelizzoli, R. et al. TTF-1/NKX2.1 up-regulates the *in vivo* transcription of nestin. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 55–62 (2008).
93. Santisteban, P., Acebron, A., Polycarpou-Schwarz, M. & Di Lauro, R. Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1310–1317 (1992).
94. Aza-Blanc, P., Di Lauro, R. & Santisteban, P. Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1297–1306 (1993).
95. Ortiz, L., Zannini, M., Di Lauro, R. & Santisteban, P. Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J. Biol. Chem.* **272**, 23334–23339 (1997).
96. Perrone, L., Pasca di Magliano, M., Zannini, M. & Di Lauro, R. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 203–208 (2000).
97. Ortiz, L., Aza-Blanc, P., Zannini, M., Cato, A. C. & Santisteban, P. The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. *J. Biol. Chem.* **274**, 15213–15221 (1999).

98. Fernandez, L. P., Lopez-Marquez, A., Martinez, A. M., Gomez-Lopez, G. & Santisteban, P. New insights into FoxE1 functions: identification of direct FoxE1 targets in thyroid cells. *PLoS ONE* **8**, e62849 (2013).
99. Hishinuma, A., Ohmika, N., Namatame, T. & Ieiri, T. TTF-2 stimulates expression of 17 genes, including one novel thyroid-specific gene which might be involved in thyroid development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **221**, 33–46 (2004).
100. Venza, I. et al. *MSX1* and *TGF-β3* are novel target genes functionally regulated by FOXE1. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1016–1025 (2010).
101. Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D. & Di Lauro, R. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4230–4241 (1992).
102. Esposito, C., Miccadei, S., Saiardi, A. & Civitareale, D. PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochem. J.* **331** (Pt 1), 37–40 (1998).
103. Czerny, T., Schaffner, G. & Busslinger, M. DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev.* **7**, 2048–2061 (1993).
104. Pellizzari, L., Fabbro, D., Lonigro, R., Di Lauro, R. & Damante, G. A network of specific minor-groove contacts is a common characteristic of paired-domain-DNA interactions. *Biochem. J.* **315** (Pt 2), 363–367 (1996).
105. Di Palma, T. et al. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J. Biol. Chem.* **278**, 3395–3402 (2003).
106. Grasberger, H. et al. Thyroid transcription factor 1 rescues PAX8/p300 synergism impaired by a natural PAX8 paired domain mutation with dominant negative activity. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1779–1791 (2005).
107. De Leo, R., Miccadei, S., Zammarchi, E. & Civitareale, D. Role for p300 in Pax 8 induction of thyroperoxidase gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 34100–34105 (2000).
108. Sastre-Perona, A. & Santisteban, P. Wnt-independent role of β-catenin in thyroid cell proliferation and differentiation. *Mol. Endocrinol.* **28**, 681–695 (2014).
109. Puppini, C. et al. Functional interaction among thyroid-specific transcription factors: Pax8 regulates the activity of Hex promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* **214**, 117–125 (2004).
110. Di Palma, T. et al. Identification of novel Pax8 targets in FRTL-5 thyroid cells by gene silencing and expression microarray analysis. *PLoS ONE* **6**, e25162 (2011).
111. Christophe-Hobertus, C. & Christophe, D. Human thyroid oxidases genes promoter activity in thyrocytes does not appear to be functionally dependent on thyroid transcription factor-1 or Pax8. *Mol. Cell. Endocrinol.* **264**, 157–163 (2007).
112. di Gennaro, A., Spadaro, O., Baratta, M. G., De Felice, M. & Di Lauro, R. Functional analysis of the murine Pax8 promoter reveals autoregulation and the presence of a novel thyroid-specific DNA-binding activity. *Thyroid* **23**, 488–496 (2013).
113. Stuart, E. T., Haffner, R., Oren, M. & Gruss, P. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* **14**, 5638–5645 (1995).
114. Dehbi, M. & Pelletier, J. PAX8-mediated activation of the wt1 tumor suppressor gene. *EMBO J.* **15**, 4297–4306 (1996).
115. Li, C. G., Nyman, J. E., Braithwaite, A. W. & Eccles, M. R. PAX8 promotes tumor cell growth by transcriptionally regulating *E2F1* and stabilizing RB protein. *Oncogene* **30**, 4824–4834 (2011).
116. Di Palma, T. et al. Pax8 has a critical role in epithelial cell survival and proliferation. *Cell Death Dis.* **4**, e729 (2013).
117. Hallaq, H. et al. A null mutation of *Hhex* results in abnormal cardiac development, defective vasculogenesis and elevated *Vegfa* levels. *Development* **131**, 5197–5209 (2004).
118. Liao, W., Ho, C. Y., Yan, Y. L., Postlethwait, J. & Stainier, D. Y. *Hhex* and *scl* function in parallel to regulate early endothelial and blood differentiation in zebrafish. *Development* **127**, 4303–4313 (2000).
119. Zamparini, A. L. et al. Hex acts with β-catenin to regulate anteroposterior patterning via a Groucho-related co-repressor and Nodal. *Development* **133**, 3709–3722 (2006).
120. Kershaw, R. M., Siddiqui, Y. H., Roberts, D., Jayaraman, P. S. & Gaston, K. PRH/HHex inhibits the migration of breast and prostate epithelial cells through direct transcriptional regulation of Endoglin. *Oncogene* <http://dx.doi.org/10.1038/nc.2013.496>.
121. Nilsson, M. & Fagman, H. Mechanisms of thyroid development and dysgenesis: an analysis based on developmental stages and concurrent embryonic anatomy. *Curr. Top. Dev. Biol.* **106**, 123–170 (2013).
122. Nettore, I. C., Cacace, V., De Fusco, C., Colao, A. & Macchia, P. E. The molecular causes of thyroid dysgenesis: a systematic review. *J. Endocrinol. Invest.* **36**, 654–664 (2013).
123. Vassart, G. & Dumont, J. E. Thyroid dysgenesis: multigenic or epigenetic, or both? *Endocrinology* **146**, 5035–5037 (2005).
124. Deladoey, J., Vassart, G. & Van Vliet, G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr. Dev.* **10**, 29–42 (2007).
125. Abu-Khudir, R. et al. Transcriptome, methylome and genomic variations analysis of ectopic thyroid glands. *PLoS ONE* **5**, e13420 (2010).
126. Nettore, I. C. et al. Identification and functional characterization of a novel mutation in the *NKX2-1* gene: comparison with the data in the literature. *Thyroid* **23**, 675–682 (2013).
127. Thorwarth, A. et al. Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel *NKX2-1* mutations and expand the phenotypic spectrum. *J. Med. Genet.* **51**, 375–387 (2014).
128. Patel, N. J. & Jankovic, J. *NKX2-1*-Related Disorders (eds Pagon, R. A. et al.) (GeneReviews®, 2014).
129. Krude, H. et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human *NKX2-1* haploinsufficiency. *J. Clin. Invest.* **109**, 475–480 (2002).
130. Willemsen, M. A. et al. Brain-Thyroid-Lung syndrome: a patient with a severe multi-system disorder due to a *de novo* mutation in the thyroid transcription factor 1 gene. *Eur. J. Pediatr.* **164**, 28–30 (2005).
131. Carre, A. et al. Five new *TTF1/NKX2.1* mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2266–2276 (2009).
132. Moya, C. M. et al. Functional study of a novel single deletion in the *TTF1/NKX2.1* homeobox gene that produces congenital hypothyroidism and benign chorea but not pulmonary distress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1832–1841 (2006).
133. Guillot, L. et al. *NKX2-1* mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in “Brain-Lung-Thyroid Syndrome”. *Hum. Mutat.* **31**, E1146–E1162 (2010).
134. Castanet, M. & Polak, M. Spectrum of Human *Foxe1/TTF2* Mutations. *Horm. Res. Paediatr.* **73**, 423–429 (2010).
135. Carre, A. et al. A novel *FOXE1* mutation (R73S) in Bamforth–Lazarus syndrome causing increased thyroidal gene expression. *Thyroid* **24**, 649–654 (2014).
136. Carre, A. et al. Polymorphic length of *FOXE1* alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum. Genet.* **122**, 467–476 (2007).
137. Santarpia, L. et al. *TTF-2/FOXE1* gene polymorphisms in Sicilian patients with permanent primary congenital hypothyroidism. *J. Endocrinol. Invest.* **30**, 13–19 (2007).
138. Szczepanek, E. et al. *FOXE1* polyalanine tract length polymorphism in patients with thyroid hemiagenesis and subjects with normal thyroid. *Horm. Res. Paediatr.* **75**, 329–334 (2011).
139. Amiel, J., Trochet, D., Clement-Ziza, M., Munnich, A. & Lyonnet, S. Polyalanine expansions in human. *Hum. Mol. Genet.* **13** (Suppl. 2), R235–R243 (2004).
140. Ramos, H. E. et al. Clinical and molecular analysis of thyroid hypoplasia: a population-based approach in southern Brazil. *Thyroid* **19**, 61–68 (2009).
141. Hermanns, P., Grasberger, H., Refetoff, S. & Pohlenz, J. Mutations in the *NKX2.5* gene and the *PAX8* promoter in a girl with thyroid dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E977–E981 (2011).
142. Hermanns, P. et al. A new mutation in the promoter region of the *PAX8* gene causes true congenital hypothyroidism with thyroid hypoplasia in a girl with Down’s syndrome. *Thyroid* **24**, 939–944 (2014).
143. Macchia, P. E. et al. *PAX8* mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat. Genet.* **19**, 83–86 (1998).
144. Narumi, S. et al. Functional characterization of four novel *PAX8* mutations causing congenital hypothyroidism: new evidence for haploinsufficiency as a disease mechanism. *Eur. J. Endocrinol.* **167**, 625–632 (2012).
145. Grasberger, H. et al. Autosomal dominant resistance to thyrotropin as a distinct entity in five multigenerational kindreds: clinical characterization and exclusion of candidate loci. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 4025–4034 (2005).
146. Carvalho, A. et al. A new *PAX8* mutation causing congenital hypothyroidism in three generations of a family is associated with abnormalities in the urogenital tract. *Thyroid* **23**, 1074–1078 (2013).
147. Meeus, L. et al. Characterization of a novel loss of function mutation of *PAX8* in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 4285–4291 (2004).
148. Amendola, E. et al. A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* **146**, 5038–5047 (2005).
149. Frezzetti, D. et al. The microRNA-processing enzyme Dicer is essential for thyroid function. *PLoS ONE* **6**, e27648 (2011).
150. Rodriguez, W. et al. Deletion of the RNaseIII enzyme dicer in thyroid follicular cells causes hypothyroidism with signs of neoplastic alterations. *PLoS ONE* **7**, e29929 (2012).
151. Perry, R. et al. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology.

- J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4072–4077 (2002).
152. Abu-Khudir, R. *et al.* Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of *FOXE1* in non-tumoral thyroid glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E1120–E1129 (2014).
153. Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* **127**, 2893–2917 (2010).
154. Nikiforov, Y. E. & Nikiforova, M. N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 569–580 (2011).
155. Moldvay, J. *et al.* The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathol. Oncol. Res.* **10**, 85–88 (2004).
156. Tan, D. *et al.* Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Hum. Pathol.* **34**, 597–604 (2003).
157. Myong, N. H. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in human lung carcinomas: its prognostic implication and relationship with expressions of p53 and Ki-67 proteins. *J. Korean Med. Sci.* **18**, 494–500 (2003).
158. Barletta, J. A. *et al.* Clinical significance of TTF-1 protein expression and *TTF-1* gene amplification in lung adenocarcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 1977–1986 (2009).
159. Yamaguchi, T., Hosono, Y., Yanagisawa, K. & Takahashi, T. *NKX2-1/TTF-1*: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. *Cancer Cell* **23**, 718–723 (2013).
160. Mu, D. The complexity of thyroid transcription factor 1 with both pro- and anti-oncogenic activities. *J. Biol. Chem.* **288**, 24992–25000 (2013).
161. Zhang, P. *et al.* Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. *Pathol. Int.* **56**, 240–245 (2006).
162. Ordóñez, N. G. Thyroid transcription factor-1 is a marker of lung and thyroid carcinomas. *Adv. Anat. Pathol.* **7**, 123–127 (2000).
163. Katoh, R. *et al.* Expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in human C cells and medullary thyroid carcinomas. *Hum. Pathol.* **31**, 386–393 (2000).
164. Gudmundsson, J. *et al.* Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat. Genet.* **41**, 460–464 (2009).
165. Ngan, E. S. *et al.* A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (*TTF-1/NKX2.1*) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J. Natl Cancer Inst.* **101**, 162–175 (2009).
166. Homminga, I. *et al.* Integrated transcript and genome analyses reveal *NKX2-1* and *MEF2C* as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **19**, 484–497 (2011).
167. Landa, I. *et al.* The variant rs1867277 in *FOXE1* gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet.* **5**, e1000637 (2009).
168. Takahashi, M. *et al.* The *FOXE1* locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2516–2523 (2010).
169. Nonaka, D., Tang, Y., Chiriboga, L., Rivera, M. & Ghossein, R. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod. Pathol.* **21**, 192–200 (2008).
170. Sequeira, M. J. *et al.* Thyroid transcription factor-2 gene expression in benign and malignant thyroid lesions. *Thyroid* **11**, 995–1001 (2001).
171. Bychkov, A. *et al.* Patterns of *FOXE1* expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry. *Thyroid* **23**, 817–828 (2013).
172. Holmberg, E., Rozell, B. L. & Toftgard, R. Differential allele loss on chromosome 9q22.3 in human non-melanoma skin cancer. *Br. J. Cancer* **74**, 246–250 (1996).
173. Venz, I. *et al.* *FOXE1* is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **162**, 1093–1097 (2009).
174. Venz, I. *et al.* Investigation into *FOXE1* genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **162**, 681–683 (2009).
175. Brune, K. *et al.* Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 3536–3542 (2008).
176. Weisenberger, D. J. *et al.* DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4689–4698 (2008).
177. Tong, G. X. *et al.* Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* **22**, 1218–1227 (2009).
178. Laury, A. R. *et al.* PAX8 reliably distinguishes ovarian serous tumors from malignant mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 627–635 (2010).
179. Wiseman, W., Michael, C. W. & Roh, M. H. Diagnostic utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of metastatic Mullerian carcinoma in effusions. *Diagn. Cytopathol.* **39**, 651–656 (2011).
180. Kroll, T. G. *et al.* PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* **289**, 1357–1360 (2000).
181. Gregory Powell, J. *et al.* The PAX8/PPAR γ fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPAR γ inhibition. *Oncogene* **23**, 3634–3641 (2004).
182. Placzkowski, K. A., Reddi, H. V., Grebe, S. K., Eberhardt, N. L. & McIver, B. The role of the PAX8/PPAR γ fusion oncogene in thyroid cancer. *PPAR Res.* **2008**, 672829 (2008).
183. Marques, A. R. *et al.* Expression of PAX8-PPAR γ 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3947–3952 (2002).
184. Cheung, L. *et al.* Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 354–357 (2003).
185. Landa, I. *et al.* An epistatic interaction between the PAX8 and *STK17B* genes in papillary thyroid cancer susceptibility. *PLoS ONE* **8**, e74765 (2013).
186. D'Elia, A. V. *et al.* Expression and localization of the homeodomain-containing protein HEX in human thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1376–1383 (2002).
187. Jankovic, D. *et al.* Leukemogenic mechanisms and targets of a NUP98/HHEX fusion in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 5672–5682 (2008).
188. Puppini, C. *et al.* HEX expression and localization in normal mammary gland and breast carcinoma. *BMC Cancer* **6**, 192 (2006).
189. Macchia, P. E. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol. Med. Today* **6**, 36–42 (2000).

Acknowledgements

The authors' work was supported by Grants BFU-2010–16025 and SAF2013-44709R from the Dirección General de Proyectos de Investigación; RD12/0036/0030 from FIS, Instituto de Salud Carlos III; and S2011/BMD-2328 from the TIRONET project from the Comunidad de Madrid. A.L.-M. holds a predoctoral Formación Personal Investigador fellowship from the Universidad Autónoma de Madrid. L.P.F. holds a postdoctoral Junta de Ampliación de Estudios-Doctores fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. We are grateful to Dr Ronald Hartong for critical reading of the manuscript and for assistance with language editing.

Author contributions

The authors contributed equally to all aspects of the article.